

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**“Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y de su mecanismo de
citotoxicidad sobre células HeLa”**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el título de
Químico Bacteriólogo Parasitólogo

Presenta:

Ana Carolina Martínez Torres

San Nicolás de los Garza, N.L.

Febrero 2008

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**“Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y de su mecanismo de
citotoxicidad sobre células HeLa”**

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Clara Eugenia Isaza Brando
Director

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Moisés Franco Molina
Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Suplente

San Nicolás de los Garza, N.L.

Febrero 2008

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”

Antonio Machado

A todos aquellos que buscan darle sentido a su existencia

A quienes no temen recorrer nuevos caminos

A todos los que siempre me apoyaron

Agradecimientos

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por su disposición de ayudarme, todo su apoyo, comentarios, y sobre todo por un ejemplo a seguir.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Clara Isaza Brando, mi asesora, por su guía, apoyo, consejos, compañía, y por todo lo que me compartió. Gracias porque siempre estuvo dispuesta a compartirme sus conocimientos.

A los demás miembros de mi comité, el Dr. Moisés Franco Molina, y el Dr. Edgar Mendoza Gamboa, por todos sus comentarios, observaciones, disponibilidad y apoyo.

Al MC Leonardo Castillo, a Don Catarino, y a todos los técnicos del laboratorio, por siempre estar dispuestos a apoyarme con IMMUNEPOTENT CRP cuando lo necesité.

A mis compañeras del laboratorio 14, Cecy, Indira, y Lily, por su compañía, por ayudarme cuando lo necesité, por su amistad, por siempre estar dispuestas a apoyarme. Ah... sin olvidar esa noche de reve en que Cecy se destapó, ¡vaya que me hicieron pasar tan buenos momentos!

A la Dra. Diana Reséndez, a la Dra. Laura Trejo, y al Dr. Pablo Zapata, por apoyarme tantas veces con equipo y reactivos.

A la demás gente querida del LIV y el LBD, a Jeannie, Paloma, Nancy, y Magda, muchísimas gracias por su apoyo, por su enseñanza, y por siempre estar ahí.

A todos los miembros del Laboratorio de Inmunología y Virología por todo lo que aportaron a este proyecto, ya que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme con equipo y consejos.

Al Dr. Mauricio Cabrera, y a sus estudiantes Hugo y Liz, muchas gracias por su ayuda, apoyo y sus consejos. Sin su ayuda no hubiera sabido como validar los resultados de mi trabajo, y tal vez aún estaría intentando hacer algo con esos datos.

A la UANL por los fondos aportados vía PAICYT para este proyecto.

Quiero agradecer también a mis amigas, por esas tardes de café en el Italian, las cenas en el Apple, las fiestas en casa de Mariel y de Imelda, las historias y consejos de Laura, Ely, y Ampa, y el tiempo de Sara, Erela, y Cynthia, todo eso me aligeró el trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia por todo su cariño y paciencia:

A mi papá, José Luis Martínez, por su apoyo, sus consejos, y especialmente por su guía.

A mi mamá, Leticia Torres, por su comprensión, por siempre estar a mi lado, y por siempre apoyarme.

A mi hermano, Augusto, por los momentos felices que pasamos juntos, y por las veces que me acompañó al laboratorio.

De igual manera agradezco al nuevo miembro de mi familia, mi compañero, mi Gael, por las veces que me acompañó al laboratorio, por echarme porras, escucharme, darme ánimo en todo momento, y sobre todo por enseñarme lo que es el amor.

Los quiero mucho.

Área de Trabajo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en San Nicolás de los Garza; bajo la Asesoría de la Dra. Clara Eugenia Isaza y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

Índice

	Página
Lista de Abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de Gráficas	
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	7
1 Cáncer	7
1.1 Cáncer cervicouterino	8
1.1.1 Células HeLa	8
1.2 Terapias	8
1.2.1 Inmunoterapia	9
1.2.2 IMMUNEPOTENT CRP	11
1.3 Apoptosis	11
1.3.1 Caspasas	13
IV. Hipótesis	18
V. Objetivos	19
VI. Materiales y Métodos	20
1. IMMUNEPOTENT CRP	20
2. Separación de fracciones de IMMUNEPOTENT	20

CRP utilizando precipitación por sulfato de amonio	
3. Separación de fracciones de IMMUNEPOTENT CRP utilizando cromatografía de Intercambio Iónico (CII)	21
4. Remoción de sal de las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP	21
5. Separación de fracciones de IMMUNEPOTENT CRP utilizando ultrafiltración	21
6. Electroforesis de proteínas en geles de Poliacrilamida (PAGE) al 15% y tinción usando azul de coomasie y nitrato de plata	22
7. Liofilización de las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP	23
8. Cultivo celular	23
9. Determinación de los cambios en la viabilidad celular como respuesta al Tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP usando el método de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).	23
10. Detección de la Actividad de Caspasas	25
VII. Resultados	26
1. Las diferentes proteínas presentes en el IMMUNEPOTENT CRP no se pueden separar por el método de precipitación con sulfato de amonio	26
2. Recolección de seis fracciones como producto del corrimiento del IMMUNEPOTENT CRP en CII	26
3. El IMMUNEPOTENT CRP fue separado en dos fracciones utilizando la ultrafiltración.	27
4. Remoción de sal de las fracciones 0.4M A, 0.4M B, 0.8M, y 1M, por medio de una columna de intercambio de sales.	32
5. El IMMUNEPOTENT CRP y las fracciones Lavado A, Lavado B, Lavado C, >1kDa, y <1 kDa disminuyen la viabilidad de células HeLa.	32

6. El IMMUNEPOTENT CRP disminuye en menor grado la viabilidad en células Vero en comparación con la disminución que provoca en células HeLa.	35
7. No se detectó activación de caspasas en células HeLa para 4h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.	37
8. El IMMUNEPOTENT CRP causa apoptosis en células HeLa, activando las caspasas 8, 10, y 3/7, a las 8h de tratamiento.	37
9. Análisis Estadístico	38
VIII. Discusión	41
1. Disminución de la viabilidad de células HeLa	42
2. Activación de Caspasas en Células HeLa	44
IX. Conclusiones	49
X. Literatura Citada	51

Lista de Abreviaturas

U	Unidades
IC ₅₀	índice de Concentración media
SFB	suero fetal bovino
DMEM	medio esencial mínimo modificado por Dulbecco
VPH	virus del papiloma humano
TNF	factor de necrosis tumoral
Apaf-1	factor apoptótico activador de proteasas -1
CARD	dominio de reclutamiento de caspasas
DED	dominio efector de muerte
TNFR1	receptor 1 del TNF
FADD	dominio de muerte asociado a Fas
TRADD	dominio de muerte asociado a TNFR1
TRAIL	ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
DISC	complejo de señalización e inducción de muerte
RE	retículo endoplásmico
ADN	ácido desoxirribonucleico
CII	cromatografía de intercambio iónico
PAGE	gel de poliacrilamida
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
R ₂	coeficiente de correlación lineal
LIV	Laboratorio de Inmunología y Virología
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Cascada de Caspasas	16
Figura 2. Las dos vías de Apoptosis	17
Figura 3. PAGE 15% teñido con Azul de coomassie de la electroforesis de: Marcadores moleculares, Fracciones del IMMUNEPOTENT CRP: 1M, 0.8M, 0.4M, 0.4MA, Lavado C, Lavado B, Lavado A, y el IMMUNEPOTENT CRP completo	27
Figura 4. PAGE 15% teñido con Azul de Coomassie, de la electroforesis de: Todas las fracciones que presentan color: IMMUNEPOTENT CRP, >1kDa, <1kDa, Lavado A, y Lavado B	30
Figura 5. PAGE 15% teñido con Nitrato de Plata, de electroforesis de: Todas las fracciones que presentaron color: IMMUNEPOTENT CRP, >1kDa, <1kDa, Lavado A, Lavado B	31
Figura 6. Trimerización de Receptores de Membrana de la superfamilia de TNF	50

Lista de Gráficas

	Página
Gráfica 1. Actividad Metabólica de células HeLa después de 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.	33
Gráfica 2. Porcentaje de actividad metabólica de células HeLa, después de 24h de tratamiento con diferentes fracciones de IMMUNEPOTENT CRP a 1.25U/mL.	34
Gráfica 3. Porcentaje de actividad metabólica de células HeLa, después de 24h de tratamiento con diferentes fracciones de IMMUNEPOTENT CRP a 1.66U/mL.	34
Gráfica 4. Actividad Metabólica de células Vero después de 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.	36
Gráfica 5. Comparación de la Actividad Metabólica de células HeLa frente a células Vero después de 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP	36
Gráfica 6. Diagrama de cajas de los resultados obtenidos de los experimentos que prueban la activación de caspasas 3/7, 4, 8, 9, y 10	39

I. Resumen

El IMMUNEPOTENT CRP, mezcla heterogénea de sustancias menores a 12 kDa, es un producto elaborado y distribuido por el Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV), de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Es un tratamiento prometedor contra células de cáncer, ya que resultados previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que tiene efecto citotóxico frente a diversas líneas tumorales y que causa apoptosis en células de melanoma y de cáncer de mama (Franco-Molina M.A. et al., 2004; Castillo P., 2007).

En el presente trabajo se determinó el efecto citotóxico del IMMUNEPOTENT CRP sobre células Vero y HeLa, y el mecanismo mediante el cual ejerce dicho efecto en las últimas. Adicionalmente, se obtuvieron diferentes fracciones del IMMUNEPOTENT CRP usando diferentes técnicas: precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y ultrafiltración, y se determinó su efecto sobre la viabilidad de la línea celular HeLa, usando la técnica del MTT. El efecto apoptótico fue estudiado analizando la activación de las caspasas: 3/7, 4, 8, 9 y 10, mediante ensayos colorimétricos.

Los resultados obtenidos muestran que el IMMUNEPOTENT CRP tiene efecto citotóxico de una manera dependiente de dosis sobre células HeLa ($R^2=0.99$), afectando en menor grado a las células Vero ($R^2=0.99$). Las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio (denominadas como: 20, 40, 60, 80 y 100 %) fueron descartadas debido a que no se lograron separar las proteínas del IMMUNEPOTENT CRP. En contraparte, tres de las fracciones obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico (denominadas Lavado A, Lavado B, Lavado C, 0.4M A, 0.4M B, 0.8M, y 1M), Lavado A, Lavado B, y Lavado C, mostraron un efecto citotóxico menor que el IMMUNEPOTENT CRP en células HeLa, descartándose las demás fracciones. Por último, las fracciones obtenidas mediante la técnica de ultrafiltración (denominadas <1kDa, y >1kDa) también mostraron efecto citotóxico, siendo la fracción <1kDa la que presentó efecto similar al demostrado por el IMMUNEPOTENT CRP.

Se determinó que el mecanismo de muerte celular inducido por el IMMUNEPOTENT CRP sobre las células HeLa, provoca la activación de las caspasas 3/7, 8, y 10, corroborando que la muerte celular es por apoptosis. La apoptosis es activada a través de la vía extrínseca, lo que se infiere por la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10, y no por la vía intrínseca, ya que no se detectó la activación de las caspasas 4 y 9.

Se concluye que el IMMUNEPOTENT CRP induce muerte celular en las células HeLa por la vía extrínseca del mecanismo de apoptosis. Además, la fracción <1kDa del IMMUNEPOTENT CRP presenta una actividad citotóxica similar al IMMUNEPOTENT CRP completo, sobre estas mismas células.

II. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y la tercera causa de muerte en México (ACS, 2007; CO, 2007; Ma X, y Yu H, 2006; Han-Chung, W., et al. 2006, INEGI, 2007). Cada año decenas de millones de personas en el mundo son diagnosticadas con esta enfermedad y alrededor de 7 millones de personas mueren por su causa (CO, 2007; Ma, X. y Yu, H. 2006; Han-Chung, W., et al. 2006). De los diferentes tipos de cáncer el que genera más muertes en la mujer en México es el cáncer cervicouterino (ISP, 2007). Este cáncer se desarrolla en la zona de transición entre la vagina y el útero, y es causado el 90% de las veces por el Virus del Papiloma Humano (VPH) (Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005).

El cáncer tiene su origen en una célula normal que se transforma, crece, invade el tejido, y finalmente se esparce a través del cuerpo (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000). Debido a esto, puede haber un tipo de cáncer por cada tipo de célula en el organismo. Para que se desarrolle el cáncer deben de existir ciertas alteraciones celulares, entre las que se encuentra la habilidad de la célula cancerosa de evadir apoptosis como consecuencia a alteraciones que bloquean las vías de muerte celular (Kaufman, S.H. y Gores, G.J. 2000; Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000; Roy, S., 2000; Meng XW et al. 2006; Hail, N. et al 2006; Reed, J.C., 2006)

La apoptosis es una forma de suicidio celular, altamente regulada y conservada en metazoos, que se distingue por sus características morfológicas y bioquímicas (Kerr, J.F.R. et al. 1972; Hetts, S.W., 1998; Lowe, S.W. and Lin, A.W., 2000; Green, D.R., 2004; Fadeel, B. and Orrenius, S. 2005; Wilk, S. 2005; Hail, N. et al. 2006). Se presenta como respuesta a estímulos externos (vía extrínseca) o internos (vía intrínseca) de muerte (Budihardjo, I. et al. 1999, Hengartner, M.O. 2000, Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002, Kohler, C. et. Al., 2002, Degterev, A. et al. 2003). Se caracteriza por tener grupos funcionales relacionados con disparar y afectar los procesos apoptóticos entre los que se encuentra la activación de cisteín-proteasas, conocidas como caspasas (Colin A. and Seamus J.M., 2006; Strasser, A. et al., 2000; Boyce, M. et al, 2004; Zhivotovsky, B. 2003; Kumar, S. and Vaux, D.L., 2002; Chang and Yang. 2002; Denault J-B. y Salvesen G.S., 2002; Hetts, S.W., 1998). El desarrollo de la activación secuencial de

caspasas, o cascada proteolítica de caspasas, conduce al corte de proteínas blanco que resulta en distintas manifestaciones bioquímicas y morfológicas indicativas del proceso de apoptosis (Nicholson, DW and Thornberry, NA. 1997.; Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y., 1998; Budihardjo, I. et al. 1999; Samali, A. et al., 1999; Hengartner, M.O. 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002; Kohler, C. et. al., 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Degterev, A. et al. 2003; Fadeel, B. and Orrenius, S., 2005; Galluzzi, L. et al., 2007). Las caspasas son activadas por medio de las dos principales vías apoptóticas (Budihardjo, I. et al. 1999; Hengartner, M.O. 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Kohler, C. et. Al., 2002; Degterev, A. et al. 2003). La vía intrínseca es mitocondria dependiente, ya que un daño en la permeabilidad de la membrana mitocondrial promoverá la liberación de diversos factores proapoptóticos que llevarán a la formación de un complejo que activará a la caspasa 9 (Li et al., 1997; Zou et al., 1999; Chinnaiyan A.M., 1999; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Yigong Shi, 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005; Degterev, A. et al. 2003; Launay, S. et al., 2005). La caspasa 9 es una de las caspasa iniciadoras de la cascada de caspasas y una vez activa activará a su vez a las caspasas efectoras 3 y 7. Recientemente se ha propuesto la caspasa 4 como una caspasa iniciadora de apoptosis inducida por estrés en el retículo endoplásmico, que se ha anexado dentro de la vía intrínseca (Shellman, Y. et al., 2007; Boyce, M. and Yuan, J., 2006). Por otra parte, en la vía extrínseca intervienen los receptores y ligandos de muerte que incluyen un subgrupo de miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). La unión receptor-ligando lleva a la formación de un complejo que activará la caspasa 8 y/o la caspasa 10, otras de las caspasas iniciadoras de la cascada de caspasas (Kischkel et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1996; Boldin et al. 1996; Muzio et al., 1996; Tschopp et al., 1998; Ashkenazi y Dixit, 1998; Walczak y Sprick, 2001; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Degterev, A. et al. 2003; Launay, S. et al., 2005; Shi, Y. 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005). A su vez, las caspasas 8 y/o 10 activarán la caspasa 3 y otras caspasas efectoras. Ambas vías convergen en la activación de caspasas efectoras, las cuales llevarán a la célula a una muerte por apoptosis (Budihardjo, I. et al. 1999, Hengartner, M.O. 2000, Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002, Kohler, C. et. al., 2002; Zhivotovsky, B., 2003; Degterev, A. et al. 2003; Shi, Y. 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005; Launay, S. et al., 2005). Dependiendo de las caspasas que sean activadas inicialmente se puede conocer cuál de las dos vías apoptóticas fue activada en la célula.

Dado que el cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas es menester que surjan tratamientos contra éste. Una meta importante en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer es el de que faciliten la apoptosis en células cancerosas (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000; Kaufman, S.H. y Gores, G.J. 2000; Lowe, S.W. y Lin, A.W., 2000; Vermeulen, K., et al. 2005; Reed J.C., 2006; Meng XW et al. 2006; Hail, N. et al 2006). Es por esto que las proteínas reguladoras de la apoptosis son uno de los principales blancos en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer (Hetts, S.W., 1998; Fischer, U. y Schulze-Osthoff, K., 2005; Vermeulen, K., et al. 2005; Hail, N. et al 2006; Reed, J.C., 2006). En la actualidad los principales tratamientos contra el cáncer son: la quimioterapia, radioterapia, cirugía, y la inmunoterapia (Han-Chung W et al., 2006). Dentro de la inmunoterapia, surge en el LIV de la UANL el IMMUNEPOTENT CRP. El IMMUNEPOTENT CRP es un tipo de inmunoterapia pasiva que contiene una mezcla heterogénea de sustancias menores de 12kDa. Este producto ha mostrado producir muerte por apoptosis en distintas líneas celulares de cáncer, sin producir efectos nocivos en células normales (Franco-Molina M.A. et al., 2006; Castillo P., 2007).

El presente trabajo busca determinar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP en células HeLa, una de las líneas celulares continuas de cáncer cervicouterino mejor caracterizadas (Masters J.R., 2002). Una de las principales metas de este estudio es comprobar si el IMMUNEPOTENT CRP es capaz de causar muerte celular por apoptosis en células HeLa y de ser así determinar cual es la vía de apoptosis desencadenada. El conocimiento del mecanismo por medio del cual IMMUNEPOTENT CRP actúa en células tumorales proveerá de información útil que permitirá encontrar nuevas aplicaciones de este producto. Además, tomando en cuenta que el IMMUNEPOTENT CRP está formado por una mezcla heterogénea de sustancia de bajo peso molecular, es posible que diferentes fracciones tengan diferente actividad citotóxica. Si se logran obtener fracciones con mayor índice de muerte celular podrían delimitarse los estudios de cáncer a fracciones específicas y con base en sus características tratar de elucidar los componentes clave en el proceso citotóxico producido por el IMMUNEPOTENT CRP.

Concluyendo, se desarrollan dos grupos de experimentos que buscan clarificar la forma en que el IMMUNEPOTENT CRP funciona a nivel celular en la línea HeLa. Uno de los grupos de experimentos tiene como objetivo determinar si el IMMUNEPOTENT CRP y sus fracciones disminuyen la viabilidad de estas células, y si alguna de estas fracciones tiene mayor efecto que el resto; y el otro grupo de experimentos tiene como objetivo determinar si el IMMUNEPOTENT CRP causa apoptosis en estas células, y de ser así, mediante que vía ejerce su efecto.

III. Antecedentes

1 Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial (CO, 2007; Jemal, A, et al. 2007). Cada año decenas de millones de personas en el mundo son diagnosticadas con esta enfermedad y alrededor de 7 millones de personas mueren por su causa (CO, 2007; Xiaomei Ma y Herbert Yu, 2006; Han-Chung, W. et al. 2006). Según datos del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) el cáncer es la tercera causa de muerte en México; el 12.7% del total de defunciones registradas en el país en el 2005 fueron debidas al cáncer (INEGI, 2007).

El cáncer es un tipo de neoplasia maligna, según la definición del oncólogo británico Sir Rupert Willis, “neoplasia es una masa anormal de tejido, con un crecimiento que sobrepasa al de los tejidos normales y no se halla coordinado con él, y que persiste con el mismo carácter excesivo una vez concluido el estímulo que provocó el cambio” (Willis R.A., 1934). El cáncer se distingue por su invasividad y por generar metástasis, que es cuando la masa de un tumor primario viaja a través del torrente sanguíneo y coloniza otros órganos del cuerpo. Las metástasis son además la causa principal de muerte por cáncer en humanos (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000; Kango-Singh M. y Hadler G., 2004).

El cáncer hace que una célula normal se transforme y dé origen a una descendencia de células transformadas. Según Hanahan y Weinberg (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000) el cáncer presenta seis alteraciones esenciales en la fisiología celular: autosuficiencia de factores de crecimiento, insensibilidad a señales anticrecimiento, evasión de la apoptosis, replicación ilimitada, angiogénesis sostenida, invasividad y metástasis. En general, las células que han sufrido la transformación no tienen la capacidad de producir apoptosis (Hetts S.W., 1998). Dado que el cáncer es un padecimiento que afecta a las células individualmente, cada tipo de célula del organismo es capaz de producir un tipo de cáncer diferente, sin embargo, algunos tipos de cáncer se desarrollan de forma más común que otros, por ejemplo los cánceres de pulmón, mama, próstata, y cervicouterino son los tipos más comunes (WHO, 2001). De

los diferentes tipos de cáncer el que genera más muertes en la mujer en México es el cáncer cervicouterino (ISP, 2007).

1.1 Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino es un tipo de cáncer que se desarrolla en el cuello del útero, que es el canal que conecta al útero con la vagina, y es causado el 90% de las veces por el Virus del Papiloma Humano (VPH) (Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte, en mujeres, por cáncer a nivel mundial (WHO, 2001). Cerca de 510,000 casos de cáncer cervicouterino son reportados al año, de los cuales alrededor del 80% se dan en países en vías de desarrollo y 77 000 de ellos en América Latina (WHO, 2001). Según la Secretaría de Salud en México el cáncer cervicouterino es la primera causa de muerte por cáncer maligno en mujeres de 25 a 64 años de edad y el tercero en mortalidad relacionada con los tumores malignos en la población en general (SSP, 2007).

1.1.1 Células HeLa

La línea celular HeLa fue obtenida en 1953 por el doctor George Gey del cáncer cervicouterino de Henrietta Lacks, una mujer afroamericana que murió a causa de este padecimiento (Masters J.R., 2002). Estas células han sido distribuidas alrededor del mundo y son utilizadas tanto en investigación contra el cáncer como en investigación biomédica no relacionada con cáncer, siendo la línea celular de cáncer más utilizada a nivel mundial (Masters J.R., 2002). Los numerosos estudios que se han hecho con las células HeLa hacen que estas células estén muy bien caracterizadas haciéndolas un prototipo ideal para utilizar como modelo del cáncer cervicouterino.

1.2 Terapias

Una vez repasados los efectos devastadores del cáncer, es necesario mencionar también las terapias para combatirlos. Existen tres tipos de terapias tradicionales contra el cáncer: la quimioterapia, la radioterapia, y la cirugía (Han-Chung W. et al., 2006). Las primeras dos se basan principalmente en atacar a las células del organismo que se

encuentran en replicación constante, por lo que no son específicas y dañan también a células normales del organismo que se encuentran en replicación permanente (Chabner BA y Roberts TG, 2005; Han-Chung, W. et al., 2006; Murdoch D y Sager J, 2008). Un problema adicional con estas terapias es que algunas células tienden a desarrollar resistencia haciendo inefectivo el tratamiento (Smith L et al. 2006; Chabner BA y Roberts TG, 2005; Kaanders JHAM, et al. 2002). El tercer tipo de terapia tradicional, la cirugía, se basa en la remoción del tejido de células transformadas; un problema que se presenta en algunos casos es que pueden permanecer células transformadas en el lugar de remoción ó productos de metástasis en otras partes del cuerpo, como se mencionó anteriormente la metástasis es una característica del cáncer, por lo que en muchas ocasiones esta terapia no es suficiente (Smith L et al. 2006; Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000; Kango-Singh M. y Hadler G., 2004). Como respuesta a los problemas que presentan las terapias tradicionales para tratar el cáncer, ha surgido la inmunoterapia. La inmunoterapia se basa en la activación del sistema inmune del paciente para que ataque el cáncer y está siendo usada como tratamiento en conjunto con las terapias tradicionales (Ferriols F. et al., 1997; ACS, 2007; Regueiro JR et al., 2003),

En México, como país en vías de desarrollo, los recursos para tratamientos oncológicos son limitados, por lo que existe un menor porcentaje de supervivencia, y un mayor sufrimiento de los pacientes en comparación con los países desarrollados (SPM, 1992). Por lo tanto, es indispensable que el país invierta en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer que ayuden a disminuir la mortandad y a mejorar la calidad de vida de las personas que sufren de este padecimiento. Actualmente en el país diversos centros de investigación y universidades, como la UANL, se encuentran generando tratamientos para combatir el cáncer al alcance de los mexicanos. Uno de los tratamientos generados es el IMMUNEPOTENT CRP, producto desarrollado por el LIV de la UANL. El IMMUNEPOTENT CRP pertenece al grupo de la inmunoterapia, tratamiento sobre el que se da más información en la siguiente sección.

1.2.1 Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tipo de terapia que hace uso del sistema inmune del paciente para combatir enfermedades (Ferriols F., 1997; ACS, 2007; Regueiro J.R, 2003).

Existen tres tipos de inmunoterapia: la inmunoterapia activa, la pasiva, y la no específica.

La inmunoterapia activa se basa en la estimulación del sistema inmune para combatir la enfermedad. Un ejemplo de este tipo de terapia es el uso de anticuerpos monoclonales, donde una gran cantidad de clonas idénticas de anticuerpos específicos a un antígeno determinado son producidos fuera del organismo para luego ser introducidos al cuerpo, son además el tipo de inmunoterapia contra el cáncer más utilizado actualmente (ACS, 2007; Ferriols F. et al., 1997; Murdoch D y Sager J, 2008). Ejemplos de este tipo de inmunoterapia son: Edrecolomab, Bexxar, Rituxan® (rituximab) y Herceptin® (trastuzumab), que han sido probados con éxito en diversos estudios con pacientes (LIN, 2006; Haller D.G, 2001), los dos últimos tratamientos ya han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en EUA (LIN, 2006; NCI 2, 2006).

La inmunoterapia pasiva se basa en la administración de componentes del sistema inmune, generados o manipulados fuera del cuerpo (ACS, 2007; Ferriols F. et al., 1997). Un ejemplo de este tipo de terapia son las vacunas contra el cáncer, las cuales contienen células de cáncer, partes de las células, o antígenos de las células. Las vacunas pueden ser preventivas o terapéuticas y tienen como fin promover el ataque del sistema inmune a las células cancerosas. Las vacunas terapéuticas se mantienen aún como terapia experimental, mientras que algunas de las preventivas ya han sido aprobadas por la FDA (ACS, 2007; NCI, 2006; Ferriols F. et al., 1997). Una de las vacunas que han sido aprobadas es Gardasil™, contra el Virus del papiloma humano, de Merk & Co. Adicionalmente hay varias vacunas nuevas que se encuentran en fase III de investigación, como son: Cervarix™, Bioovaxid®, y Provenge®, contra el cáncer cervicouterino, el linfoma folicular de células B, y el cáncer de próstata respectivamente, del Nacional Cancer Institute en EUA; MDX-1379, contra el melanoma cutáneo de Medarex, Inc.; y GVAX®, contra el cáncer de próstata, de Cell Genesys, Inc.

La inmunoterapia no específica se basa en la estimulación general del sistema inmune, por ejemplo mediante el uso de citocinas o adyuvantes (ACS, 2007; Ferriols F. et al., 1997; NCI 2, 2006). Las citocinas son fabricadas por células del sistema inmune y tiene como fin la regulación de la actividad y del crecimiento de células de la sangre y del propio sistema inmune (Regueiro J.R. et al., 2003). Los adyuvantes se definen como

cualquier sustancia que ayude a incrementar la actividad del sistema inmune, y se utilizan principalmente en conjunto con otro tipo de terapia (ACS, 2007). Dos ejemplos de adyuvantes no específicos son bacillus Calmette-Guerin (BCG) y levamisole. El primero es una bacteria que ha sido atenuada, y el segundo es un antiparasítico. Estos adyuvantes han mostrado resultados favorables en tratamientos contra el cáncer (NCI 2, 2006; FDA, 1998; FDA 2, 1998; García J. et al., 2007).

El IMMUNEPOTENT CRP es un ejemplo de inmunoterapia pasiva generada en México, específicamente en nuestro estado, por el LIV de la UANL. Esta terapia se basa en la administración de componentes del sistema inmunológico, que son obtenidos y manipulados fuera del organismo.

1.2.2 IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP, como se mencionó, es un tipo de inmunoterapia pasiva. Esta clasificación se hace con base en el hecho de que el IMMUNEPOTENT CRP es un dializado de una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular liberadas por leucocitos desintegrados de bazo de bovino. Este producto, elaborado y distribuido por el LIV de la UANL, es un producto no tóxico para células normales y puede ser administrado por: vía oral parenteral y por vía intramuscular (Kirkpatrick C.H., 2000; Franco-Molina M.A. et al., 2004; Castillo P., 2007).

El efecto del IMMUNEPOTENT CRP ha sido probado en distintas líneas de células cancerígenas como lo son las células de cáncer de mama, MCF-7 (Franco-Molina M.A. et al., 2006), y las células de melanoma, B16F10 (Castillo P., 2007). En estos experimentos se corroboró que, como en la mayoría de los tratamientos contra el cáncer, el IMMUNEPOTENT CRP causa apoptosis en estas líneas celulares.

1.3 Apoptosis

La palabra apoptosis fue acuñada en 1972 por Kerr y colaboradores (Kerr et al., 1972) y es comúnmente conocida como muerte celular fisiológica, dado que es un proceso de muerte que ocurre de forma normal en los tejidos. La apoptosis es un proceso complejo

por medio del cual las células no requeridas o sin uso son eliminadas del organismo. Este tipo de eliminación celular se presenta durante procesos biológicos normales, como el desarrollo embrionario, la preservación de la homeostasis del cuerpo, la senescencia de las células y el daño celular, por lo que también es comúnmente denominada muerte celular programada (Hetts S.W., 1998; Lowe, S.W. and Lin, A.W., 2000; Green, D.R. 2003; Fadeel, B. and Orrenius, S. 2005; Wilk, S. 2005; Vermeulen K., 2005; Hail N., 2006). La apoptosis es un proceso que ocurre en las células individualmente, es altamente regulado por diversos pasos enzimáticos y sus características principales son la dependencia de ATP, la fragmentación del DNA (mono y oligonucleosomal), la ausencia de respuesta inflamatoria, y la liberación de citocromo C (Hetts S.W., 1998; Green D.R., 2003; Vermeulen K., 2005; Hail N., 2006).

Para que se lleve a cabo la apoptosis existen diversos elementos clave: los receptores de muerte, las alteraciones membranales, los cambios mitocondriales, y la cascada de proteasas (Degterev A. et al., 2003; Green D.R., 2003; Hetts S.W., 1998; Strasser A. et al., 2000; Wilk S. 2005). Esta última involucra señales que llevan a la activación de una familia de cisteín proteasas intracelulares altamente específicas conocida como caspasas, que son las responsables de la mayoría de las características morfológicas de la célula apoptótica (Kohler et al. 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Sahara et al., 1999; Wolf et al., 1999; Sebbagh et al., 2001; Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y., 1998).

Existen dos vías principales de apoptosis: la vía extrínseca (provocada por estímulos externos) y la vía intrínseca (provocada por estímulos internos) (Budihardjo, I. et al. 1999, Hengartner, M.O. 2000, Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002, Kohler, C. et. Al., 2002, Degterev, A. et al. 2003). La vía extrínseca involucra la interacción entre receptores de muerte anclados en la membrana celular y las señales de muerte, lo que da pie a que las proteínas adaptadoras, situadas en el citoplasma, transfieran la señal dentro de la célula y recluten otras moléculas, entre ellas las caspasas 8 y/o 10, que una vez activadas desencadenan el proceso apoptótico (Kischkel et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1996; Boldin et al. 1996; Muzio et al., 1996; Tschopp et al., 1998; Ashkenazi y Dixit, 1998; Walczak y Sprick, 2001; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Degterev, A. et al. 2003; Launay, S. et al., 2005; Shi, Y. 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005). La vía intrínseca ocurre por un daño intracelular, y generalmente comienza con la permeabilización de la membrana de la mitocondria, que se produce como respuesta a

proteínas activadas por daños celulares, lo que causa la liberación del citocromo C que, en conjunto con Apaf-1 (Factor apoptótico activador de proteasas -1) y la procaspasa 9, forma el apoptosoma activando la caspasa 9, la cual dispara la apoptosis (Li et al., 1997; Hetts S.W., 1998; Zou et al., 1999; Chinnaiyan A.M., 1999; Strasser A. et al., 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Shi Y., 2002; Degterev A. et al., 2003; Green D.R., 2003; Shi, Y. 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005; Degterev, A. et al. 2003; Launay, S. et al., 2005). El fin último de ambas vías es la muerte celular por apoptosis (Budihardjo, I. et al. 1999, Hengartner, M.O. 2000, Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002, Kohler, C. et. al., 2002; Zhivotovsky, B., 2003; Degterev, A. et al. 2003; Shi, Y. 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005; Launay, S. et al., 2005).

1.3.1 Caspasas

Las caspasas son cisteín proteasas altamente específicas que cortan a su sustrato después de un ácido aspártico. Son las moléculas ejecutoras en la apoptosis y son activadas por medio de las dos principales vías apoptóticas (Budihardjo, I. et al. 1999; Hengartner, M.O. 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Kohler, C. et. Al., 2002; Degterev, A. et al. 2003; Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y., 1998). Estas moléculas son las que desencadenan los cambios morfológicos que dan a la célula apoptótica sus características distintivas, dado que cuando se activan destruyen componentes clave en la infraestructura celular y activan factores que median daño en la célula (Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A.. 1997.; Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y., 1998; Budihardjo, I. et al. 1999; Sahara et al., 1999; Wolf et al., 1999; Samali, A. et al., 1999; Hengartner, M.O. 2000; Sebbagh et al., 2001; Shi Y., 2002; Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002; Kohler et al. 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Fadeel, B. and Orrenius, S., 2005; Galluzzi, L. et al., 2007).

Las caspasas se encuentran de manera normal en la célula como zimógenos inactivos de cadena simple, nombrados procaspasas (Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y., 1998; Kohler et al. 2002; Shi Y., 2002; Denault JB y Salvensen GS, 2002; Degterev A. et al., 2003; Zhivotovsky, B. 2003; Friedlander R.M., 2003; Hail N., 2006). Las procaspasas están compuestas por un prodominio amino terminal seguido por las subunidades p20 grande y p10 pequeña. La transición de procaspasa a caspasa ocurre por una serie de cortes proteolíticos que primero separan la subunidad grande y pequeña, y después remueven

el prodominio. Las caspasas son activas cuando forman heterotetrámeros constituidos de dos subunidades p10 y dos subunidades p20 provenientes de dos procaspasas (Kohler et al. 2002; Shi Y., 2002; Degterev A. et al., 2003; Zhivotovsky, B. 2003; Friedlander R.M., 2003).

Las caspasas son clasificadas de acuerdo a sus funciones o a la longitud de su prodominio (Kohler et al. 2002; Denault JB y Salvensen GS, 2002; Degterev A. et al., 2003; Friedlander R.M., 2003; Zhivotovsky, B. 2003). Las dos clasificaciones están interrelacionadas ya que al conocer la longitud del prodominio se puede inferir la función de la caspasa (Kohler et al. 2002; Shi Y., 2002; Denault J-B. y Salvesen G.S., 2002; Degterev A. et al., 2003; Friedlander R.M., 2003; Zhivotovsky, B. 2003). Las caspasas con prodominio largo pueden tener un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) o un dominio efector de muerte (DED). El dominio CARD sirve para uniones caspasa-caspasa, así como para unir la procaspasa-9 con el cofactor APAF-1 y de esta manera activar la caspasa 9. El dominio DED sirve para unir las procaspasas 8 y/o 10 a una molécula adaptadora (como FADD o TRADD) para activar estas caspasas (Kohler et al. 2002; Shi Y., 2002; Denault J-B. y Salvesen G.S., 2002; Degterev A. et al., 2003; Thornberry N. y Lazebnik Y., 1998; Friedlander R.M., 2003; Zhivotovsky, B. 2003; Simstein R et al, 2003). Las caspasas que presentan un prodominio largo son las llamadas caspasas iniciadoras y son las caspasas que se activan primero al iniciar el proceso de apoptosis, mientras que las caspasas que tienen un prodominio corto son las caspasas ejecutoras, las cuales son activadas por las caspasas iniciadoras (Kohler et al. 2002; Shi Y., 2002; Denault J-B. y Salvesen G.S., 2002; Degterev A. et al., 2003; Thornberry N. y Lazebnik Y., 1998; Friedlander R.M., 2003; Zhivotovsky, B. 2003; Simstein R et al, 2003).

Gracias a que ambas vías apoptóticas comienzan con diferentes caspasas iniciadoras, es posible inferir cuál vía apoptótica fue activada en una célula bajo condiciones determinadas. En los experimentos propuestos para este proyecto las caspasas que se miden son: las caspasas iniciadoras 9 (vía intrínseca o de mitocondria), 10 y 8 (vía extrínseca o de receptores celulares de muerte), y la caspasa 4 (una caspasa recientemente propuesta como iniciadora de la vía intrínseca del retículo endoplasmático (Shellman, Y. et al., 2007; Boyce, M. and Yuan, J., 2006)); y las caspasas ejecutoras 3/7. Midiendo la activación de estas caspasas se puede conseguir

suficiente información para proponer cuál de las dos vías de activación de la apoptosis se inició en las células HeLa como respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.

En el caso de la vía extrínseca la activación de las caspasas se produce como respuesta a un estímulo recibido por los receptores membranales de muerte, que son proteínas transmembranales pertenecientes a la superfamilia del TNF (Factor de necrosis tumoral) (Walczak y Sprick, 2001; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Degterev, A. et al. 2003; Launay, S. et al., 2005; Shi, Y. 2004; Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005). Las caspasas activadas inicialmente en la vía extrínseca son la caspasa 8 y/o la caspasa 10 (figura 1 y 2). La vía intrínseca de activación de la apoptosis se da como respuesta a estímulos celulares tales como daño en el ADN, y fármacos citotóxicos (Degterev A. et al., 2003). En la vía intrínseca la primera caspasa en activarse es la caspasa 9. La activación de la caspasa 9 se produce al formarse el apoptosoma, producto de la unión del Apaf-1, la procaspasa 9 y el citocromo C (Shi Y., 2002; Degterev A. et al., 2003, Friedlander R.M., 2003) (figura 1 y 2). Estas dos vías se unen por medio de la actividad de la proteína Bid, la cual es activada por la caspasa 8 y/o 10 (Li et al., 1998; Scaffidi et al., 1998) (figura 1 y 2). La vía intrínseca mediada por el estrés del retículo endoplasmático se puede producir cuando hay un daño por la disrupción de la homeostasis de iones calcio, la inhibición de la glicosilación de proteínas, o por la acumulación de proteínas mal plegadas (figura 2) (Kaufman, 2002; Boyce, M. y Yuan, J., 2006; Zhang y Kaufman, 2006; Shellman, Y. et al., 2007). Se ha propuesto que esta vía es iniciada por la caspasa 12 en ratones (Nakagawa et al., 2000) o por la caspasa 4 que es su homólogo activo en humanos (Kim et al, 2006). Cualquiera que sea la vía de iniciación de la apoptosis el resultado es la activación de las caspasas ejecutoras (caspasas -3, y/o -6, y/o -7). La activación de las caspasas ejecutoras será lo que, finalmente, provoque las características fisiológicas de la apoptosis.

En la figura 1 se muestra el papel que juega cada una de las caspasas evaluadas en la apoptosis y en cada una de las vías correspondientes. En la figura 2 se muestran las dos vías apoptóticas descritas anteriormente.



Figura 1 adaptada de Fan T.-J. et al. (Fan T.-J. et al., 2005). Cascada de caspasas.

Las caspasas se encuentran normalmente como procaspasas inactivas, que se activan como respuesta a señales específicas, generando una cascada de activación, es decir, que al activarse una caspasa ésta activará otras caspasas del mismo tipo mediante su acción proteolítica sobre ellas, para detalles extra sobre la figura favor referirse al texto.

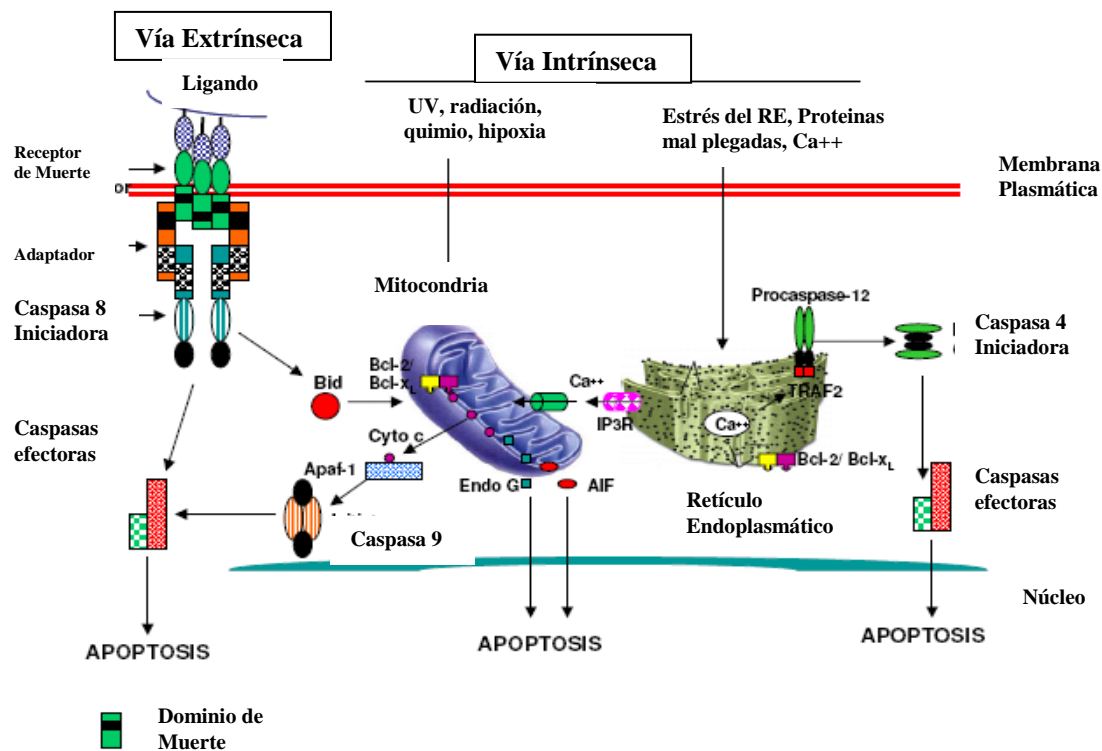


Figura 2 Adaptada de Gupta S et al. 2006. Las dos vías de Apoptosis.

En la figura se ilustran los factores externos que va a desencadenar las principales vías apoptóticas: la vía extrínseca (por medio de ligandos) y los dos tipos de vía intrínseca que son: por mitocondria y estrés por RE.

IV. Hipótesis

El IMMUNEPOTENT CRP causa muerte celular por apoptosis en células HeLa, y sus diferentes fracciones tienen diferente efecto sobre la viabilidad celular de las mismas.

V. Objetivos

1. Determinar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad de las células HeLa obteniendo la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) para 24h de tratamiento.
2. Determinar si el IMMUNEPOTENT CRP induce apoptosis en células HeLa y de ser así por cuál vía actúa, mediante la detección de la activación de las caspasas 3/7 (efectoras), la detección de la activación de las caspasas 9 y 4 (vía intrínseca), y la detección de la activación de las caspasas 10 y 8 (vía extrínseca).
3. Determinar la o las fracciones activas del IMMUNEPOTENT CRP que tienen un mayor efecto citotóxico sobre células HeLa.

VI. Materiales y Métodos

1. IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP es producido y distribuido por el LIV de la FCB de la UANL, ubicado en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Para la producción del IMMUNEPOTENT CRP se usa la metodología descrita en Franco-Molina MA et al. 2006. En breve, el IMMUNEPOTENT CRP es un extracto dializable de leucocitos de bovino de bajo peso molecular (menos de 12kDa) que es obtenido de bazo de bovino, el cual es homogenizado, dializado en agua usando una membrana con poros de corte de 10kDa, y finalmente liofilizado. La unidad de medida usada para cuantificar el IMMUNEPOTENT CRP es la ‘unidad’ (U) que se define como la cantidad de IMMUNEPOTENT CRP producido de la diálisis de 1.5×10^9 leucocitos.

2. Separación de fracciones de IMMUNEPOTENT CRP utilizando precipitación por sulfato de amonio.

La técnica de separación de proteínas por precipitación de sulfato de amonio se basa en la separación de proteínas por su punto máximo de solubilidad. Para separar diferentes fracciones de una muestra mediante la precipitación por sulfato de amonio, la sal se administra en diferentes pasos hasta obtener los diferentes porcentajes de saturación en la solución, en el caso de este trabajo los porcentajes escogidos fueron: 20%, 40%, 60%, 80%, y 100%, de saturación.

Se utilizaron 100U de IMMUNEPOTENT CRP sin liofilizar a las cuales se le añadió poco a poco el sulfato de amonio requerido para alcanzar uno a uno los diferentes porcentajes de saturación. Una vez fue alcanzado el porcentaje de saturación buscado, la solución fue dejada por diez minutos bajo constante agitación. Al terminar el tiempo la solución fue centrifugada por quince minutos a 10000g. En cada paso se guardó la pastilla y se continuó trabajando con el sobrenadante hasta llegar a la siguiente saturación deseada, todo el procedimiento se realizó a 4°C.

3. Separación de fracciones de IMMUNEPOTENT CRP utilizando cromatografía de Intercambio Iónico (CII)

Este método de separación de fracciones de IMMUNEPOTENT CRP se basa en las interacciones carga-carga que se dan entre las proteínas de la muestra y las cargas inmovilizadas en la resina de la columna. La columna usada para esta separación contenía 1mL de resina, la resina utilizada en este experimento es de intercambio aniónico, dietilaminoetil de flujo rápido (DEAE-FF, GE Healthcare). Para correr la muestra en la columna se diluyeron 30U de IMMUNEPOTENT CRP en 3.5mL de agua bidestilada. Esta solución se esterilizó por filtración (filtro MILLEX GP .22µm de MILLIPORE) y se pasó 1mL a la vez, a través de la columna DEAE-FF, a una velocidad de 1mL/min. Después se utilizaron 5mL de agua bidestilada para el lavado inicial, y 5mL de cada una de las siguientes soluciones de NaCl: 0.4M, 0.8M NaCl, y 1M, para fluir por la columna. Se recolectaron las distintas fracciones obtenidas para cada una de las concentraciones de NaCl usadas; cuando se observaron cambios en el color del eluyente para una misma concentración de sal las fracciones se recolectaron en tubos diferentes.

4. Remoción de sal de las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP

Una vez obtenidas las diferentes fracciones del IMMUNEPOTENT CRP se removió el NaCl. La remoción de sal de las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP se realizó por medio de una columna de intercambio de sales, Sephadex G-25 superfino de 5mL (Hi Trap Desalting de GE Healthcare). Esta columna permite la separación de grupos entre sustancias de alto y bajo peso molecular. Para llevar a cabo este procedimiento se siguió el protocolo sugerido por el fabricante de las columnas, GE Healthcare.

5. Separación de fracciones de IMMUNEPOTENT CRP utilizando ultrafiltración

La técnica de la ultrafiltración es una técnica en la cual una solución se filtra a través de una membrana, en este caso fue utilizada una membrana MILLIPORE de celulosa regenerada con un poro que permite el paso de sustancias menores de 1kDa, reteniendo en su superficie todas aquellas moléculas con peso mayor a 1kDa. Para realizar la ultrafiltración se diluyeron 30U de IMMUNEPOTENT CRP en 10mL de agua

bidestilada, esta solución fue colocada en una celda para ultrafiltración de MILLIPORE bajo presión de nitrógeno. Se recolectaron ambas fracciones, alrededor de 9.5mL de solución de moléculas con peso molecular menor a 1kDa y alrededor de 0.5mL de solución de moléculas con peso molecular mayor a 1kDa.

6. Electroforesis de proteínas en geles de Poliacrilamida (PAGE) al 15% y tinción usando azul de coomasie y nitrato de plata

Para determinar la cantidad y el tamaño de las proteínas presentes en el IMMUNEPOTENT CRP y sus fracciones se realizó una electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. El porcentaje de acrilamida usado fue de 15% siguiendo el protocolo sugerido por BIORAD (BIO-RAD, basado en el protocolo original descrito por Laemmli U.K., 1970).

La visualización de las diferentes bandas de proteínas en los geles se realizó usando dos técnicas diferentes de tinción para proteínas con distinto grado de detección, la tinción de plata y la tinción con azul de coomassie. Las tinciones se realizaron siguiendo los protocolos de Hahn Laboratory, para la tinción de plata, e INCBIO MEDICAL para la tinción de coomassie, basados en los protocolos originales de Ansorge (1985) y Bradford (1976) respectivamente (Ansorge, W, 1985; Bradford, MM, 1976). La tinción con azul de coomassie permite detectar desde 0.6µg de proteína y es cuantitativo hasta los 20 µg. Sintetizando, para la tinción de los geles con azul coomassie se sumergió el gel en 200mL de solución de coomassie (solución acuosa de 1% (W/V) Coomassie Blue (Serva Blau), 40% metanol, y 10% ácido acético glacial) por 24h. Pasado el tiempo de inmersión en el tinte se removió el exceso de colorante mediante cambios constantes de solución acuosa de 40% metanol y 20% ácido acético glacial hasta lograr visualizar las bandas de proteínas. Las concentraciones de cada uno de los componentes de la solución de coomassie y la solución de lavado son las recomendadas por INCBIO MEDICALS, Inc (Ansorge, W, 1985). La tinción de plata se utilizó como alternativa para la tinción de proteínas por su gran sensibilidad, ya que detecta desde 10ng de proteína por banda. La concentración de cada uno de los reactivos se basa en las sugerencias de The Hahn Laboratory (Coachman K. et al., 2002).

7. Liofilización de las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP es producido como un liofilizado, lo que hace posible que pueda ser resuspendido en diferentes tipos de líquidos según el uso para el cual es requerido. La liofilización es un proceso que se basa en la evaporación de agua por sublimación, lo que permite obtener el material sólido presente en la solución que se sometió al proceso. La liofilización de las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP fue realizada utilizando el liofilizador Freezer Dry System Labconco, USA, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

8. Cultivo Celular

Las líneas celulares que se utilizaron en este trabajo fueron HeLa y Vero, que fueron donadas amablemente por el laboratorio de Biología del Desarrollo, que forma parte de la FCB de la UANL. Los cultivos celulares fueron conservados siguiendo los protocolos estándar sugeridos por el American Type Culture Collection (ATCC). El medio en que fueron mantenidos es Dulbecco's Modified Eagle's Medium/mezcla nutricional F-12 (DMEM F-12) con suero fetal bovino (SFB) al 10%, (SIGMA-ALDRICH, Inc). El medio de cultivo empleado es preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para despegar las células de la placa, se utilizó la solución de Trypsin-EDTA (SIGMA-ALDRICH, Inc.), siguiendo el protocolo de la ATCC. El conteo celular se realizó usando azul tripán (solución de 0.4% de SIGMA-ALDRICH, Inc.), una cámara Neubauer, y un microscopio óptico, siguiendo el protocolo establecido por la ATCC.

9. Determinación de los cambios en la viabilidad celular como respuesta al Tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP usando el método de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Antes de comenzar los experimentos donde se midió la actividad del IMMUNEPOTENT CRP sobre las células HeLa, fue establecida la cantidad de tratamiento a utilizar. Estos experimentos se realizaron para 24 horas de incubación con IMMUNEPOTENT CRP debido a que se requería que un tiempo corto de tratamiento produjera un efecto observable. Las células no malignas Vero fueron utilizadas como

control (Sharifah, S.A. et al. 2007; Labrador, V. et al., 2007), sometiéndolas a tratamientos exactamente iguales que a las células HeLa.

Para determinar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP y sus fracciones sobre la viabilidad de las células HeLa se realizó un ensayo basado en la reducción del MTT. Este método es un ensayo colorimétrico que permite calcular el porcentaje de células metabólicamente activas en un cultivo. El principio en que se basa el método del MTT es que las células metabólicamente activas son capaces de reducir las sales de MTT formando cristales morados insolubles (SIGMA-ALDRICH, Inc. Adaptado de: Slater, T. et al. (1963), Mossman, T. (1983), Denizot, F. y Lang, R. (1986), y Carmichael, J. et al. (1987)). Los cristales formados son posteriormente solubilizados y la absorbancia de la solución es medida a 570nm.

En este estudio se prepararon diluciones del IMMUNEPOTENT CRP en medio DMEM 10% SFB hasta obtener fracciones de 0.2U, 0.4U, 0.5U, 0.6U, 0.8U, 1U, 1.25U, y 1.66U por mililitro, las cuales fueron esterilizadas pasándolas a través de un filtro de un poro de .22 μm (MILLEX, GP de MILLIPORE). Las muestras fueron tratadas de esta misma forma para los estudios sobre la actividad de las fracciones del IMMUNEPOTENT CRP, obtenidas por ultrafiltración y por CII.

Para realizar los ensayos de MTT en células HeLa y Vero, se sembraron en cajas estériles de 96 pozos de fondo plano (Corning, USA) 10^4 células por pozo en un volumen de 100 μL . La cajas de cultivo se incubaron por 24h a 37°C con atmósfera controlada humidificada de 5% $\text{CO}_2 \pm 0.5\%$, para permitir que las células se adhirieran a la placa, para luego aplicarles 100 μL de cada uno de los tratamientos a los pocillos destinados para fungir como experimento. Una vez administrado el tratamiento las cajas se incubaron durante 21 horas. Luego de 21 horas de incubación con tratamiento se aplicaron 20 μL de una solución de MTT (SIGMA-ALDRICH, Inc.) disuelto en PBS (pH 7.2), a una concentración de 5mg/mL, a cada pozo de cultivo, para luego incubar las placas por 3 horas adicionales. Al terminar esta última incubación se retiró el medio y el exceso de MTT de cada pozo, y posteriormente fueron agregados 100 μL de sulfóxido de dimetil (SIGMA-ALDRICH, Inc.). Pasados 5 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570nm, en un lector de placas ELISA (BIO-TEC Instruments, USA).

Las lecturas espectrofotométricas del ensayo MTT para la susceptibilidad de células HeLa al IMMUNEPOTENT CRP se presentan como unidades de densidad óptica relativa (U.D.O.R.). Las U.D.O.R se calcularon como el cociente de la densidad óptica (D.O.) de los cultivos tratados con el IMMUNEPOTENT CRP entre la D.O. de los cultivos control (los no tratados).

10. Detección de la actividad de Caspasas

En este proyecto se midieron cambios en la actividad de las caspasas como respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. Para realizar estas mediciones se decidió usar los kits colorimétricos de BioVision para cada una de las caspasas que se decidieron medir (3/7, 4, 8, 9 y 10). Estos kits utilizan sustratos peptídicos de cuatro aminoácidos, específicos para cada caspasa, marcados con el cromóforo p-nitroanilido (pNA). Los sustratos son: LEVD para caspasa 4, IETD para caspasa 8, DEVD para caspasa 3 y 7 (compartiendo estas dos su sustrato), LEHD para caspasa 9, y AEVD para caspasa 10. Cuando la caspasa corta el sustrato, libera la molécula de pNA que tiene un máximo de absorción óptica a 405 nm. Para saber cuales fueron las caspasas que se activaron con el tratamiento, en este caso IMMUNEPOTENT CRP, se compararon los cambios de absorbancia entre los cultivos tratados y los cultivos control. El protocolo seguido para obtener estos resultados es el sugerido por la compañía productora: BioVision (para caspasa 4, 8, 9, 10, y 3, con números de catálogo: K127-25, K113-25, K119-25, K125-25, K106-25 respectivamente).

VII. Resultados

1. Las diferentes proteínas presentes en el IMMUNEPOTENT CRP no se pueden separar por el método de precipitación con sulfato de amonio.

Se intentó separar las proteínas presentes en el IMMUNEPOTENT CRP utilizando el método de separación de proteínas por precipitación con sulfato de amonio, siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos.

Para conocer el grado de separación de las proteínas, las fracciones obtenidas por el método de precipitación por sulfato de amonio (a 20%, 40%, 60%, 80%, y 100% de saturación) fueron corridas en un gel de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés) y teñidas usando el método de tinción de plata (ver materiales y métodos), para determinar si efectivamente se veían diferencias en las bandas de proteínas en las diversas fracciones. Se utilizó la tinción de plata, que es un método muy sensible, para poder detectar proteínas aún a muy baja concentración. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencia en cuanto a la presencia o ausencia de bandas para las diferentes fracciones, lo que quiere decir que no hay separación de las diferentes proteínas respecto a su solubilidad, usando la precipitación por sulfato de amonio. Adicionalmente los resultados para este ensayo mostraron que hay agregación de algunas proteínas, lo que hace que el método de separación por precipitación con sulfato de amonio no sea exitoso para este caso.

2. Recolección de seis fracciones como producto del corrimiento del IMMUNEPOTENT CRP en CII.

Al ver que la separación por precipitación con sulfato de amonio no funcionó, se intentó separar el IMMUNEPOTENT CRP por medio de la CII. Para ello se siguió el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Las fracciones que se recogieron son: Lavado A, Lavado B y Lavado C (estas tres para la elusión con agua bidestilada), 0.4M A, 0.4M B, 0.8M, 1M (donde la molaridad se refiere a la concentración de la solución de NaCl usada en la elusión de las fracciones). Las fracciones de Lavado fueron separadas por color; la primera es amarillo oscuro, la segunda amarillo claro y la tercera

no tiene color, con volúmenes de 0.8mL, 0.2mL, y 4mL, respectivamente. Las fracciones provenientes de la elusión con NaCl fueron también separadas por color, para la elusión con 0.4M NaCl se observó que la primera fracción, de 1.2mL, tiene color amarillo mientras que la segunda, de 3.8mL, no tiene color. Las fracciones provenientes de la elusión con concentraciones de 0.8 y 1 M NaCl no mostraron diferencia en su coloración, por lo que se tomó la fracción completa, de 5mL, para cada caso.

Las fracciones obtenidas fueron corridas en un PAGE 15% y teñidas usando el método de tinción de azul de coomasie (ver materiales y métodos) para determinar si efectivamente se veían diferencias en las bandas de proteínas en las diferentes fracciones. Como se muestra en la figura 3 las fracciones que tienen diferencia con respecto a las demás son Lavado A y Lavado B, donde aparece una banda de proteína de bajo peso molecular, mientras que en las demás fracciones esta banda no aparece. En todos los carriles del gel aparecen bandas de alto peso molecular (a baja concentración) indicando que hay agregación de proteínas (se descartan proteínas de alto peso molecular debido a que el método de obtención del IMMUNEPOTENT CRP no permite la presencia de proteínas de más de 12kDa (ver materiales y métodos)). El hecho de que el IMMUNEPOTENT CRP continúe disminuyendo la viabilidad de células cancerosas aún cuando el estado de sus proteínas haya cambiando, nos hace suponer que el principio activo pueda encontrarse en alguna de las proteínas que no se agregan o en componentes no proteicos.



Figura 3. PAGE 15% teñido con Azul de coomassie de la electroforesis de: Marcadores moleculares, Fracción de IMMUNEPOTENT CRP 1M, 0.8M, 0.4M, 0.4MA, Lavado C, Lavado B, Lavado A, y el IMMUNEPOTENT CRP completo.

En la fotografía se observa agregación de proteínas en todas las fracciones, incluyendo el IMMUNEPOTENT CRP completo. En las fracciones Lavado A y Lavado B, aparece una banda de proteína de bajo peso molecular, mientras que en las demás fracciones esta banda no aparece.

3. El IMMUNEPOTENT CRP fue separado en dos fracciones utilizando la ultrafiltración.

Teniendo los resultados anteriores, donde se mostró en el PAGE 15% que había proteínas de alto y bajo peso molecular en el IMMUNEPOTENT CRP, se prosiguió a separarlo por el método de ultrafiltración, usando para ello una membrana de 1 kDa, donde se esperaba tener una fracción proteica y una no proteica.

Se siguió el protocolo descrito en materiales y métodos, y se obtuvieron las fracciones >1kDa y <1kDa. La primera tiene un color amarillo-rojizo oscuro y la segunda un color amarillo claro. Ambas fracciones, junto con las fracciones Lavado A, Lavado B, y el IMMUNEPOTENT CRP, fueron corridas en un PAGE 15% y teñidas usando el método de tinción con azul de coomasie (materiales y métodos) para determinar si efectivamente había una diferencia que indicara la separación de la fracción proteica de la no proteica.

En la figura 4 se aprecia la gel teñida con azul de coomasie, ahí se observa que sí se logró separar el IMMUNEPOTENT CRP en una fracción con proteínas y otra sin proteínas. Para descartar que una cantidad menor de proteínas estuviera presente en la fracción de <1kDa, y observando que solo una banda del IMMUNEPOTENT CRP se apreciaba claramente, se decidió usar la tinción de plata para corroborar los resultados obtenidos.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos con la tinción de plata, donde se corrobora que no hay proteínas en la fracción de <1kDa, que la fracción de >1kDa está muy concentrada, y que hay una ligera diferencia entre Lavado A y Lavado B que no es apreciable con la tinción de coomasie. En el carril donde se corrió la fracción de >1kDa (figura 5) se observan distintas bandas que corresponden a proteínas de distintos pesos moleculares. Este resultado sigue mostrando la agregación de las proteínas, sugiriendo que la agregación de las proteínas del IMMUNEPOTENT CRP se da en agua o en solución con sales de diferentes tipos. En el carril donde se corrió la muestra de <1kDa no aparece ninguna banda de proteína, ni siquiera usando la tinción con plata que es mucho más sensible que la tinción con azul de coomasie, esto indica la ausencia de proteínas.



Figura 4. PAGE 15% teñido con Azul de Coomassie, de la electroforesis de:
Todas las fracciones que presentan color: IMMUNEPOTENT CRP, >1kDa, <1kDa,
Lavado A, y Lavado B

En la figura solo se aprecian bandas en las fracciones >1kDa, Lavado A, Lavado B, y una banda muy tenue del IMMUNEPOTENT CRP completo. No se observa ninguna banda para la fracción de <1kDa.



Figura 5. PAGE 15% teñido con Nitrato de Plata, de electroforesis de:

Todas las fracciones que presentaron color: IMMUNEPOTENT CRP, >1kDa, <1kDa, Lavado A, Lavado B

Se corrieron las mismas fracciones que en la Figura 4, pero se tiñeron con tinción de plata.

En el carril del IMMUNEPOTENT CRP completo están presentes las mismas bandas que se observan en el carril de más de 1kDa, sin embargo algunas no se alcanzan a diferenciar debido a que tiene una menor concentración de proteínas. En el carril de la fracción de >1kDa se aprecia que está cargada de bandas de proteínas de alto y bajo peso molecular, por lo que se puede deducir que es una fracción muy concentrada. En el carril de la fracción de <1kDa se puede corroborar que la fracción se obtuvo sin proteínas ya que no se observa ninguna banda. Finalmente en el carril perteneciente al Lavado B, se aprecia una banda de proteínas menos que en el carril del Lavado A.

4. Remoción de sal de las fracciones 0.4M A, 0.4M B, 0.8M, y 1M por medio de una columna de intercambio de sales.

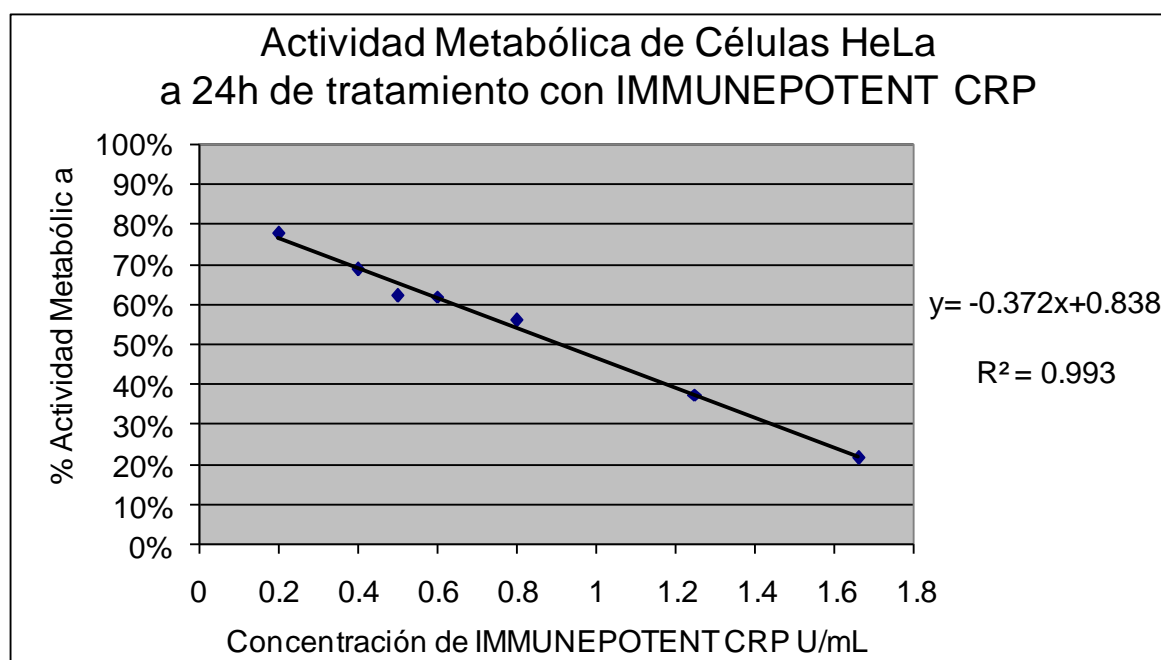
Teniendo las fracciones provenientes de la CII, se prosiguió a realizar la remoción de la sal presente en las fracciones siguiendo el protocolo de materiales y métodos. Esto con el fin de poder administrar las distintas fracciones a las células como tratamiento.

Después de correr las muestras por la columna para la remoción de sales, se prosiguió a liofilizar las fracciones, diluirlas en medio DMEM 10% SFB y administrárselas a las células. Sin embargo, al ver al microscopio los controles de las diferentes fracciones, se observaron cristales de sal en todas las fracciones exceptuando las tres fracciones de Lavado, que son las que no requieren de sal para ser fluidas. Teniendo en cuenta esto, se descartaron las fracciones 0.4M, 0.8M y 1M como tratamientos para las células HeLa.

5. El IMMUNEPOTENT CRP y las fracciones Lavado A, Lavado B, Lavado C, más de 1kDa, y menos de 1 kDa disminuyen la viabilidad de células HeLa.

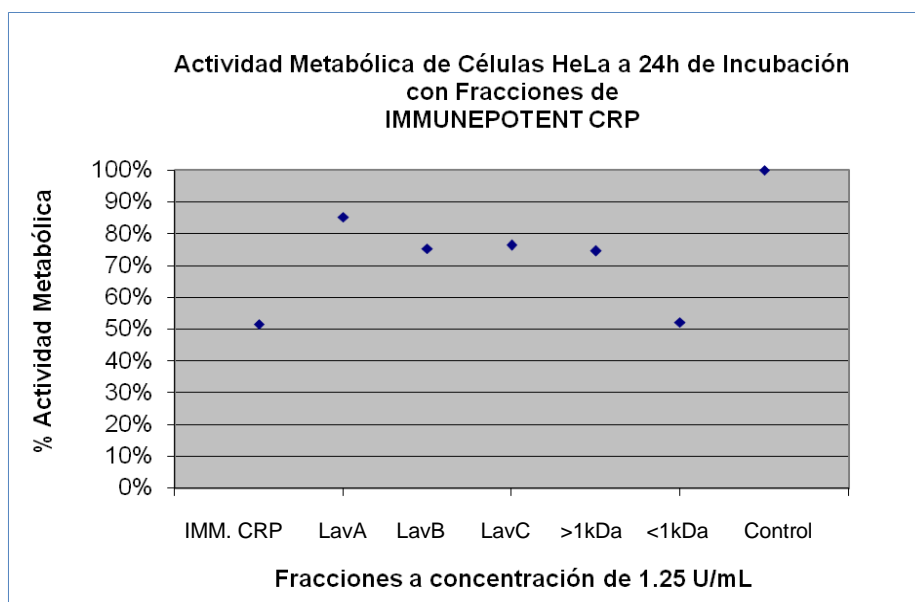
Los efectos citotóxicos del IMMUNEPOTENT CRP en células HeLa fueron medidos usando el ensayo MTT. Se encontró que el IMMUNEPOTENT CRP reduce la viabilidad celular, y que la disminución depende linealmente de la concentración (gráfica 1). La IC_{50} calculada para tratamiento de 24h es de 0.9 U/mL.

El efecto de las diferentes fracciones del IMMUNEPOTENT CRP, obtenidas por los métodos antes descritos, sobre la viabilidad de células HeLa fue también estudiado usando el ensayo MTT. En la gráfica 2 se muestra el patrón de disminución de la actividad metabólica de las células HeLa provocado por las diversas fracciones, cuya concentración fue ajustada para que el tratamiento correspondiera a 1.25 U/mL. En la gráfica 3 se muestra la disminución de la actividad metabólica de las células HeLa provocada por las fracciones de IMMUNEPOTENT CRP a una concentración de 1.66 U/mL. Se puede apreciar que en ambas concentraciones las fracciones provocan el mismo patrón de disminución de la viabilidad en las células HeLa. La fracción <1kDa muestra tener un mayor efecto citotóxico en células HeLa a comparación de los demás.



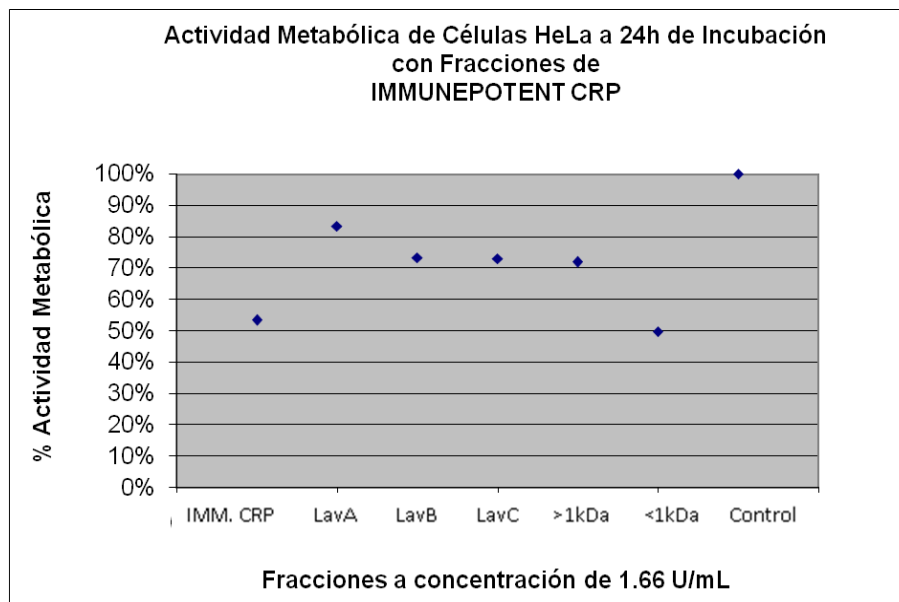
Gráfica 1. Actividad Metabólica de células HeLa después de 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.

En la figura se observa la actividad metabólica de células HeLa después de haber dado tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. La viabilidad de las células control, sin tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP, fue de 100%. Con base en la ecuación de la gráfica se obtuvo que el IC_{50} es de 0.9U/mL para el IMMUNEPOTENT CRP en células HeLa.



Gráfica 2. Porcentaje de actividad metabólica de células HeLa, después de 24h de tratamiento con diferentes fracciones de IMMUNEPOTENT CRP a 1.25U/mL.

En la figura se observa que el IMMUNEPOTENT CRP y la fracción de <1kDa disminuyen al mismo porcentaje la actividad metabólica de células HeLa, mientras que las demás fracciones la disminuyen también pero en menor proporción.



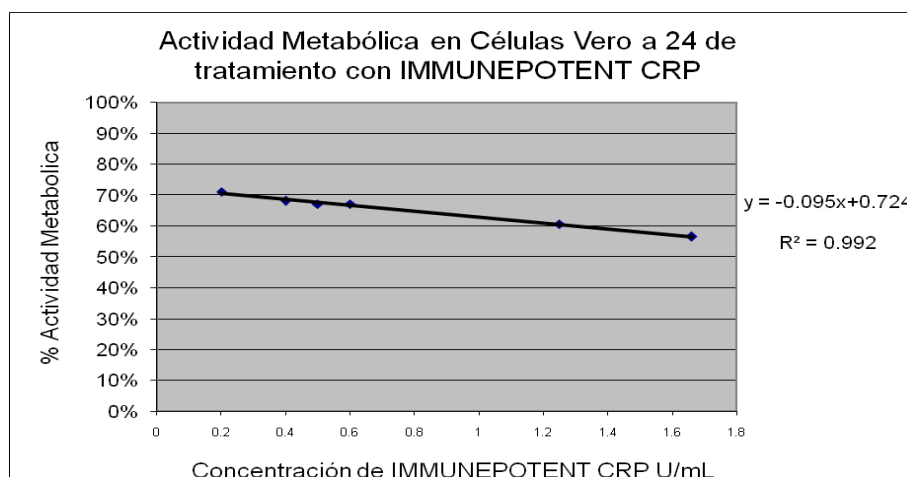
Gráfica 3. Porcentaje de actividad metabólica de células HeLa, después de 24h de tratamiento con diferentes fracciones de IMMUNEPOTENT CRP a 1.66U/mL.

En la figura se observa que el IMMUNEPOTENT CRP y la fracción de <1kDa disminuyen al mismo porcentaje la actividad metabólica de células HeLa, mientras que las demás fracciones la disminuyen también pero en menor proporción.

6. El IMMUNEPOTENT CRP disminuye en menor grado la viabilidad en células Vero a comparación con la disminución que provoca en células HeLa.

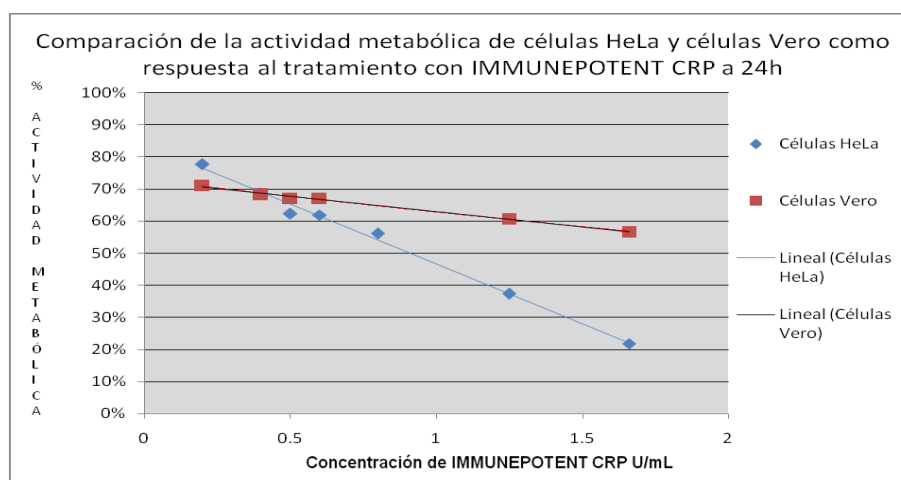
Una vez obtenidos los resultados que mostraron que el IMMUNEPOTENT CRP causa disminución de la viabilidad celular en la línea HeLa, se prosiguió a descartar la disminución de la viabilidad de células Vero, comúnmente utilizadas como control (Sharifah, S.A. et al. 2007; Labrador, V. et al., 2007). Se utilizó el IMMUNEPOTENT CRP a diferentes concentraciones como tratamiento para probar la disminución de la viabilidad en células Vero por el método de MTT.

En la gráfica 4 se aprecia que las células Vero utilizadas como control muestran una baja disminución de la viabilidad, ya que ninguna de las concentraciones de IMMUNEPOTENT CRP usadas para esta prueba alcanza el IC₅₀. Además, la pendiente que indica la velocidad de la disminución celular es 4 veces mayor para células HeLa que la de células Vero, indicando una disminución en la viabilidad mucho más rápida en el primer caso (gráfica 5). Esto nos indica que el IMMUNEPOTENT CRP disminuye selectivamente la población de células HeLa, manteniendo alta la viabilidad de células normales.



Gráfica 4. Actividad Metabólica de células Vero después de 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.

En la figura se observa la actividad metabólica de células Vero después de haber dado tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. La viabilidad de las células control, sin IMMUNEPOTENT CRP, fue de 100%. Usando la ecuación de la gráfica se estima que el IC₅₀ es de 2.3U/mL de IMMUNEPOTENT CRP para células Vero.



Gráfica 5. Comparación de la Actividad Metabólica de células HeLa frente a células Vero después de 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.

En la figura se observa la comparación de la actividad metabólica de células HeLa y células Vero después de haber dado tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP por 24h. Se observa que aunque inicialmente la viabilidad de las células Vero decrece más que la de las células HeLa, la actividad metabólica permaneció prácticamente estable, descendiendo solo hasta concentraciones de más de 1U/mL de IMMUNEPOTENT CRP.

7. No se detectó activación de caspasas en células HeLa para 4h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP.

Las células HeLa fueron tratadas con 1.25U/mL de IMMUNEPOTENT CRP e incubadas por 4h para después medir la actividad de las caspasas 3/7, 4, 8, 9, y 10 (ver materiales y métodos). Se utilizó un método colorimétrico (ver sección Materiales y Métodos) capaz de medir la activación de caspasas para determinar si la muerte celular inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en células HeLa es apoptosis dependiente de caspasas. Se comenzó probando la actividad de las caspasas a 4h de tratamiento con considerando que a este tiempo las células no tienen prácticamente ningún cambio en su morfología y que la cantidad de células es prácticamente igual que en el control, lo que permitiría tener una idea de los eventos iniciales provocados por el IMMUNEPOTENT CRP. Usando el método de detección descrito no se observó activación de ninguna de las caspasas estudiadas, ni siquiera de las caspasas 3/7 que multiplicarían la activación de las caspasas iniciadoras.

8. El IMMUNEPOTENT CRP causa apoptosis en células HeLa, activando las caspasas 8, 10, y 3/7, a las 8h de tratamiento.

Teniendo en cuenta que a las 4h de tratamiento no se detectó activación de las caspasas analizadas, se prosiguió a medir la actividad de las mismas caspasas estudiadas (3/7, 4, 8, 9 y 10) a un tiempo más largo de tratamiento, 8h. La elección de este tiempo de tratamiento se hizo considerando la morfología y la disminución de células que se podía observar para 8h de tratamiento con 1.25U/mL. La activación de las caspasas se midió siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos para determinar si había habido activación de estas caspasas. Los resultados obtenidos muestran que las caspasas 3/7, 8 y 10 se activan (gráfica 6). La activación de las caspasas 3/7 nos sugieren que la cascada de caspasas sigue su camino una vez iniciada la apoptosis por las caspasas iniciadoras como respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. La activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10 nos indican que la vía de apoptosis activada por el IMMUNEPOTENT CRP en células HeLa es la vía extrínseca. La ausencia de activación de la caspasa 9 nos indica que estamos midiendo eventos iniciales ya que la cascada de caspasas todavía no ha llegado a activar la vía intrínseca.

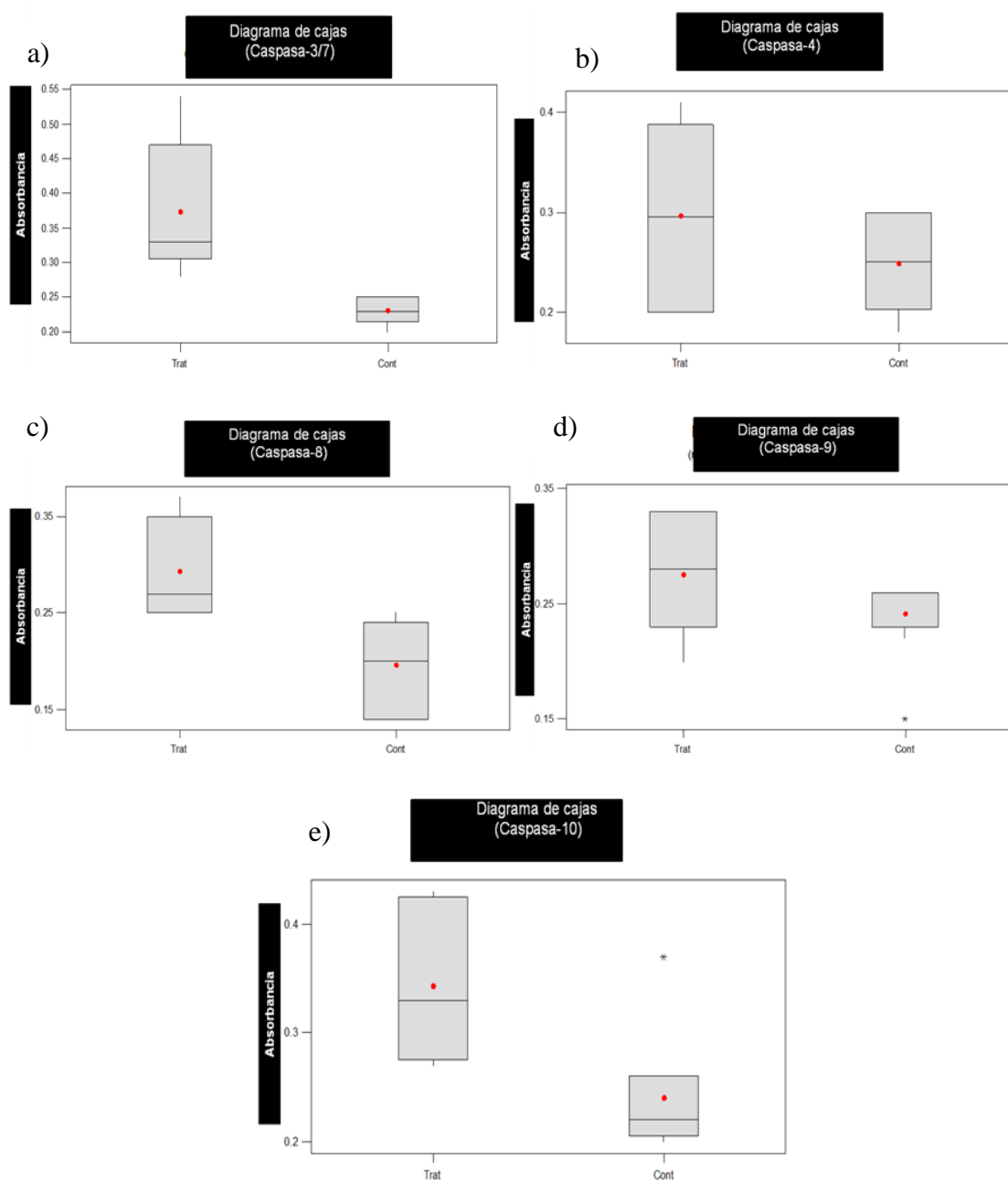
9. Análisis Estadístico

Se realizaron dos pruebas estadísticas para determinar si había habido activación de caspasas en células HeLa después de 8h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP (Montgomery C., 2004). Ambas pruebas se hicieron con un valor de $\alpha = 0.05$

Uno de los análisis estadísticos consistió en la prueba T de dos muestras con varianzas desconocidas, utilizada en muestras con distribución normal (Murray S., 2001). La prueba confirmó que la absorbancia del tratamiento es mayor que la del control para caspasas 3, 8, y 10, pero no para caspasas 4 y 9.

Para reforzar la conclusión se realizó la prueba Mann-Whitney, no paramétrica, que no asume una distribución normal de las muestras (Hollander M, Wolfe D., 1999). La prueba no paramétrica confirmó que la absorbancia del tratamiento es mayor que la del control para caspasas 3, 8, y 10, pero no para caspasas 4 y 9.

El hecho de que ambas pruebas hubieran concluido lo mismo, indica que los resultados son confiables.



Gráfica 6. Diagrama de cajas de los resultados obtenidos de los experimentos que prueban la activación de caspasas 3/7, 4, 8, 9, y 10.

En los diagramas se observan las desviaciones, las medias y las medianas de las desviaciones estándar de las replicas y repeticiones de los ensayos realizados, donde las cajas abarcan el rango de los resultados obtenidos, las líneas horizontales dentro de las cajas son las medianas, y los puntos dentro de las cajas son las medias. Para que una caspasa fuera considerada como activa no debía haber traslape entre las cajas

correspondientes a tratamiento y control, adicionalmente la absorbancia del tratamiento debe ser mayor a la del control. a) No hay traslape entre las cajas de tratamiento con las de control para caspasa 3/7. b) Las cajas de tratamiento y control se traslapan para caspasa 4. c) No hay traslape entre las cajas de tratamiento y control para caspasa 8. d) Las cajas de tratamiento y control se traslapan para caspasa 9. e) No hay traslape entre las cajas de tratamiento con las de control para caspasa 10.

VIII. Discusión

El desarrollo de tratamientos contra el cáncer es uno de los objetivos primordiales en la actualidad debido a que esta enfermedad es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y los tratamientos para combatirla son muy costosos (ACS, 2007; CO, 2007; Ma X, y Yu H, 2006; Han-Chung, W., et al. 2006). El IMMUNEPOTENT CRP es un tratamiento que ha demostrado provocar apoptosis en diversas líneas tumorales *in vitro* (Franco-Molina MA et al. 2006; Castillo P., 2007), y es por tanto una nueva alternativa de tratamiento contra el cáncer. Dado su potencial, en este trabajo se decidió investigar uno de los mecanismos moleculares por medio del cual el IMMUNEPOTENT CRP actúa en células HeLa. Este conocimiento es de interés ya que permitiría proponer nuevas aplicaciones o posibles contraindicaciones.

Específicamente se englobaron dos estudios en este proyecto. El primer estudio buscaba determinar si el IMMUNEPOTENT CRP es capaz de disminuir la viabilidad en células HeLa, utilizando para esto el ensayo del MTT (Mosmann, T., 1983). En este experimento se midió la actividad citotóxica que produce el IMMUNEPOTENT CRP, a diferentes concentraciones en células HeLa. También se fraccionó el tratamiento con base a sus características bioquímicas, como el peso molecular y carga iónica, con el fin de elucidar si alguna fracción del IMMUNEPOTENT CRP, con características específicas, tiene una mayor actividad citotóxica contra la línea tumoral aquí estudiada.

El segundo estudio se realizó con el fin de explorar la causa de la disminución de la viabilidad de células HeLa como respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. Para esto se utilizaron ensayos colorimétricos que permiten conocer la actividad enzimática de las caspasas. En este estudio se emplearon los ensayos para las tres caspasas iniciadoras de las dos vías apoptóticas mejor conocidas (caspasas 9, 10, y 8) (Budihardjo, I. et al. 1999; Hengartner, M.O. 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Kohler, C. et al., 2002; Degterev, A. et al. 2003) y una caspasa iniciadora de una vía recientemente caracterizada (caspasa 4) (Shellman, Y. et al., 2007; Boyce, M. and Yuan, J., 2006). En este segundo estudio se incluyó también un ensayo colorimétrico para detectar la actividad de las caspasas efectoras 3/7, utilizadas como marcador bioquímico de apoptosis (Kroemer, G. et al, 2005; Barrett, K.L., 2001; Kohler

et al. 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Fadeel, B. and Orrenius, S., 2005; Hengartner, M.O., 2000).

1.- Disminución de la viabilidad celular en células HeLa.

Para determinar si el IMMUNEPOTENT CRP tiene actividad citotóxica o no en las células HeLa se empleó el ensayo del MTT, que detecta actividad de la deshidrogenasa mitocondrial, determinando así la actividad metabólica de las células (Mossman, T, 1983).

Las células HeLa se trataron con IMMUNEPOTENT CRP a diferentes concentraciones: 0.2U/mL, 0.4U/mL, 0.5U/mL, 0.6U/mL, 0.8U/mL, 1.25U/mL, y 1.66U/mL. En la gráfica 1 se pudo apreciar que después de 24 horas de incubación el IMMUNEPOTENT CRP tiene actividad citotóxica dependiente de la concentración. El R^2 de la regresión lineal de los datos obtenidos (viabilidad celular contra concentración de IMMUNEPOTENT CRP) es de 0.99, lo que permite afirmar que la disminución en la viabilidad de células HeLa inducida por el IMMUNEPOTENT CRP tiene una correlación lineal negativa con respecto a la concentración del tratamiento. Usando la gráfica 1 se pudo calcular el IC₅₀ de IMMUNEPOTENT CRP para células HeLa, el IC₅₀ calculado es de 0.9 U/mL, siendo esta concentración más elevada que la IC₅₀ del IMMUNEPOTENT CRP reportada para otras líneas celulares de cáncer (Franco-Molina MA et al. 2006). El valor IC₅₀ para células HeLa calculado por cada mil células es de 0.09U/mL, mientras que los resultados reportados (por cada mil células) son de: 0.012U/mL para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-, 0.04 U/mL para A-427, BT-474, y Calu-1, 0.051U/mL para L5178Y, y 0.066 U/mL para la línea celular U937 (Franco-Molina MA et al. 2006).

Para determinar si la actividad del IMMUNEPOTENT CRP es selectiva contra células de cáncer se probó el tratamiento en la línea celular Vero, que ha sido utilizada como control en pruebas citotóxicas (Chung, Y et al. 2004; Ooi, L. et al. 2004; Sharifah, S.A. et al. 2007; Labrador, V. et al., 2007). Como se muestra en la gráfica 5, una concentración de 1.66U/mL de IMMUNEPOTENT CRP, que en células HeLa disminuyó 80% de la viabilidad celular, en células Vero no logró disminuirla más de

del 40%. Esto es indicativo de selectividad del IMMUNEPOTENT CRP frente a células HeLa, como se ha demostrado en otros ensayos donde la citotoxicidad de tratamientos contra el cáncer muestran disminuir la viabilidad de células Vero en menor proporción que en células tumorales (Chung, Y et al. 2004; Ooi, L. et al. 2004). La existencia de cierta citotoxicidad frente a células Vero puede deberse a que esta línea celular, pese a carecer de actividad tumoral al ser administrada a roedores inmunosuprimidos, es una línea celular modificada de forma que pueden crecer de forma ilimitada bajo las condiciones adecuadas (Sheets R, 2000). Estudios publicados anteriormente (Franco-Molina MA et al. 2006), muestran que las células mononucleares de sangre periférica no se ven afectadas por el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. Esto hace suponer que sean las características que convierten a las células Vero en una línea celular continua las que hayan causado la disminución en la viabilidad de estas células en respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. Resultados reportados (Franco-Molina MA et al. 2004; Franco-Molina MA et al. 2005; Franco-Molina MA et al. 2006; Castillo P 2007), establecen que tanto in vitro como in vivo, el IMMUNEPOTENT CRP carece de actividad citotóxica frente a células normales, tanto humanas como animales, pero sí muestra citotoxicidad selectiva frente células tumorales (Franco-Molina MA et al. 2006; Castillo P 2007). En investigaciones previas se estableció que el IMMUNEPOTENT CRP no disminuye la viabilidad en macrófagos humanos con un tratamiento de hasta 0.132U/mL por cada mil células (Franco-Molina MA et al. 2006).

Con el fin de estudiar si diferentes fracciones del IMMUNEPOTENT CRP tienen diferentes efectos citotóxicos, se procedió a fraccionar la solución acuosa del mismo. La precipitación con sulfato de Amonio en este caso no funcionó, por lo que se decidió probar la CII. Del corrimiento del IMMUNEPOTENT CRP en la CII las fracciones Lavado A, Lavado B y Lavado C, fueron las únicas que se usaron como tratamiento en células HeLa. Por otro lado, notando que el IMMUNEPOTENT CRP no pierde su actividad a pesar de someterse a distintas variables como temperatura y tiempo (comunicación oral del Dr. Moisés Franco-Molina), se buscó determinar si una fracción no proteica tiene actividad en el IMMUNEPOTENT CRP. Para explorar esta posibilidad se separó el IMMUNEPOTENT CRP en fracciones mayores y menores de 1kDa utilizando el método de ultrafiltración por una membrana con un poro de 1kDa. En la figura 5 se muestra que en el carril de más de 1kDa aparecen numerosas bandas de proteínas fuertemente teñidas, mientras que en la fila de menos de 1kDa no aparece

ninguna banda. Por lo tanto se puede concluir que sí se logró separar el IMMUNEPOTENT CRP en una fracción que contiene proteínas y una fracción que no contiene proteínas, ya que el método de tinción usado permite detectar proteínas en el rango de los nanogramos.

Las cinco fracciones obtenidas pueden ser administradas como tratamiento ya que no contienen factores externos que afecten el crecimiento celular, por lo que se decidió probar su actividad citotóxica frente a células HeLa a concentraciones que a 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP completo mostraron tener una fuerte citotoxicidad. Las concentraciones de 1.25U/mL y 1.66U/mL permitieron comparar la actividad citotóxica, en células HeLa, de las cinco fracciones con aquella producida por el IMMUNEPOTENT CRP sin fraccionar. En las gráficas 2 y 3 se muestra que efectivamente, la fracción <1kDa mostró la misma actividad citotóxica que el IMMUNEPOTENT CRP frente a células HeLa. Las demás fracciones mostraron compartir su citotoxicidad, disminuyendo en un 20%-30% la actividad metabólica de células HeLa. Como se observa en ambas figuras, no hubo diferencia en el porcentaje de disminución de la viabilidad de las células HeLa, ya que para ambas concentraciones se disminuyó un 50% la viabilidad celular. Esto nos indica que hay una pequeña variabilidad en la actividad del IMMUNEPOTENT CRP entre diferentes lotes, esto se concluye debido a que los experimentos fueron hechos con lotes distintos.

Es notorio que la fracción de menos de 1kDa posee una mayor actividad citotóxica frente a células HeLa que las demás fracciones. Esto hace suponer que una molécula no proteica está fuertemente involucrada en la actividad del IMMUNEPOTENT CRP sobre células HeLa. Esta información abre una línea de investigación directa sobre los componentes de esta fracción. Una investigación más profunda de esta fracción ayudará a elucidar el mecanismo de acción y por ende las posibles nuevas aplicaciones y contraindicaciones de IMMUNEPOTENT CRP.

2. Activación de caspasas en células Hela.

Las caspasas constituyen una familia, de cisteín proteasas altamente específicas, conservada en todos los organismos multicelulares (Nicholson y Thornberry, 1997;

Hetts, S.W., 1998; Hengartner, M.O. 2000; Strasser, A. et al., 2000; Kumar, S. and Vaux, D.L., 2002; Chang and Yang. 2002; Denault J-B. y Salvesen G.S., 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Boyce, M. et al, 2004; Boyce, M. et al., 2004; Ho P-K y Hawkins, C.J., 2005; Colin A. and Seamus J.M., 2006; Hail N. et al., 2006). De las 12 caspasas codificadas en el genoma humano que son conocidas hasta ahora, por lo menos siete (caspasas 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10) participan de manera activa en la muerte celular por apoptosis (Chang y Yang, 2000; Zhivotovsky, B. 2003; Boyce, M. et al., 2004; Launay, S. et al. 2005). Las caspasas activan una cascada proteolítica que termina con el corte de un grupo de proteínas que producen las características morfológicas de la apoptosis (Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A.. 1997.; Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y., 1998; Budihardjo, I. et al. 1999; Samali, A. et al., 1999; Hengartner, M.O. 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S. 2002; Kohler, C. et. al., 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Degterev, A. et al. 2003; Fadeel, B. and Orrenius, S., 2005; Galluzzi, L. et al., 2007).

Las caspasas apoptóticas se dividen en dos grupos dependiendo de su función: caspasas iniciadoras, que son las que se activan inicialmente cuando se recibe la señal apoptótica, y las caspasas efectoras, que son activadas por las caspasas iniciadoras y que participan activamente en el desensamblaje celular (Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A.. 1997; Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y.. 1998.; Strasser A., 2000; Hengartner, M.O., 2000; Kohler, C. et. al., 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Launay, S. et al. 2005; Hail N. et al., 2006). Las caspasas iniciadoras son: la 2, la 8, la 9, la 10, y la recientemente propuesta caspasa 4 (Shellman, Y. et al., 2007; Boyce, M. and Yuan, J., 2006); y las caspasas efectoras son: la 3, la 6, y la 7 (Budihardjo, I. et al. 1999; Hengartner, M.O. 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Kohler, C. et. Al., 2002; Degterev, A. et al. 2003). La forma secuencial de activación de las caspasas ha llevado a que estos eventos de activación sean nombrados "cascada de caspasas". Un evento proapoptótico desencadena la activación de caspasas iniciadoras, las cuales activarán a las caspasas efectoras, y éstas a su vez activarán caspasas efectoras e iniciadoras (Stennicke HR y Salvensen GS, 1999; Strasser A., 2000; Denault, J.B. y Salvesen, G.S., 2002; Degterev, A. et al. 2003; Boyce M et al., 2004; Shi Y, 2007). Hasta el momento no se conoce ningún tipo de muerte celular aparte de la apoptosis en la cual estén involucradas las caspasas, esto no quiere decir que la apoptosis dependa exclusivamente de las caspasas, pero sí que una vez activada la cascada de caspasas la célula se compromete a apoptosis (Samali, A. et al., 1999; Kroemer, G. et al, 2005; Galluzzi, L. et al., 2007).

La asignación de las caspasas como reguladores importantes de la apoptosis ha sido hecha con base en estudios donde se ha demostrado que la sobre expresión de caspasas lleva a las células a apoptosis, que los inhibidores de las caspasas frecuentemente modifican el tipo de muerte celular haciendo posible que se pase de apoptosis a necrosis o a autofagia (Chiara M. et al., 2007; Bredesen, D.E., 2007; Galluzzi L. et al., 2007; Shao, Y. et al., 2004, Gozuacik D. y Kimchi A., 2004), y que los animales con knockout para alguna caspasa apoptótica sufren de profundos defectos en la apoptosis (Samali, A. et al., 1999; Ekert et al., 1999; Chang y Yang, 2000; Zheng y Flavell, 2000; Kohler et al. 2002; Mary C. Abraham y Shai Shaham. 2004; Colin Adrain, C., y Martin, J.S.. 2006).

Por lo anteriormente expuesto, la activación de las caspasas es considerada un método bioquímico para detectar apoptosis (Hengartner, M.O., 2000; Barrett, K.L., 2001; Kohler et al. 2002; Zhivotovsky, B. 2003; Fadeel, B. and Orrenius, S., 2005; Kroemer, G. et al, 2005). En este trabajo se midió la activación de las caspasas iniciadoras 4, 8, 9 y 10 y la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 con el fin de detectar si el IMMUNEPOTENT CRP causa o no apoptosis en células HeLa y de ser así por cuál de las dos rutas apoptóticas ejerce su efecto. Para medir la viabilidad celular se evaluó la disminución de la actividad metabólica mitocondrial de las células, que es un indicativo de muerte celular. Al comprobar que el IMMUNEPOTENT CRP disminuye la viabilidad celular en células HeLa, el siguiente paso fue determinar si este efecto se debía a la iniciación de la cascada de caspasas. Para responder a lo anterior, se midió la activación de las caspasas iniciadoras de las dos vías principales de apoptosis y la activación de las caspasas efectoras 3/7. Los resultados obtenidos muestran que el IMMUNEPOTENT CRP efectivamente activa la cascada de caspasas, confirmando que este producto causa apoptosis en células HeLa. El método utilizado en este trabajo detecta directamente la actividad de la caspasa; para que la actividad de una caspasa sea detectada, la enzima debe cortar su sustrato. Con el método de detección seleccionado se asegura no tener falsos positivos, ya que se ha reportado en la literatura que en diversas ocasiones se han encontrado, por medio de Immunoblotting, caspasas procesadas que teóricamente deberían estar activas pero que son incapaces de cortar su sustrato (Zhivotovsky, B., 2003; Kohler, C. et al. 2002).

Para probar la actividad de las caspasas y buscando que aun no estuvieran todas las caspasas activas, como ocurre en la activación masiva de caspasas, se decidió probar la activación de caspasas a las 4h de haber dado tratamiento de 1.25U/mL de IMMUNEPOTENT CRP a las células. Cabe recalcar que esta concentración la obtuvimos con base en pruebas de ensayo, hasta que logramos determinar que esta concentración era la adecuada para este tipo de ensayo. Sin embargo, a este tiempo de tratamiento no se puede detectar la activación de caspasas con el método usado. El método colorimétrico utilizado requiere una concentración relativamente alta de enzimas activas, por lo que concluimos que después de 4h de tratamiento con la concentración utilizada de IMMUNEPOTENT CRP, no hay una cantidad suficiente de caspasas activas, sin que esto signifique que no hay caspasas activas, sólo que no hay suficientes para que puedan ser detectadas en el ensayo.

Considerando el resultado para 4h de tratamiento, se prosiguió a medir la actividad de caspasas a las 8h de tratamiento. Después de 8h de tratamiento con 1.25U/mL de IMMUNEPOTENT CRP se detectó la activación de algunas de las caspasas que fueron seleccionadas. Las caspasas iniciadoras 10 y 8, y las caspasas ejecutoras 3/7, son las caspasas cuya actividad pudo ser detectada (gráfica 6). Dado que las caspasas iniciadoras con mayor porcentaje de actividad fueron las caspasas de la vía extrínseca, se puede concluir que el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP activa, bajo las condiciones descritas, esta vía apoptótica en células HeLa.

Los resultados obtenidos en este experimento permiten proponer que el mecanismo por medio del cual el IMMUNEPOTENT CRP actúa en células HeLa es a través de receptores transmembranales triméricos de la superfamilia del TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Para que estos receptores sean activos, debe haber una trimerización de las proteínas provocada ya sea por su ligando o por algún factor inductor de esta trimerización (ver figura 6). Este trímero de los receptores de membrana, una molécula adaptadora, y una procaspasa iniciadora de la vía extrínseca, forman un complejo de muerte denominado “complejo de señalización e inducción de muerte”, o DISC (death-inducing signalling complex), que activa las caspasas iniciadoras 8 y 10 (Lacour, S et al. 2003; Peter, ME, y Krammer, PH, 2003). Para el caso del tratamiento de las células HeLa con IMMUNEPOTENT CRP los resultados obtenidos nos permiten proponer que la activación de las procaspasas 8 y 10 se produce por la formación de este complejo de

muerte, sin embargo, no es concluyente la información para determinar si la oligomerización de los receptores es causada por un ligando o por un inductor de la oligomerización, como es por ejemplo la timidin kinasa/ganciclovir (TK/GCV) (Peter, ME, y Krammer, PH, 2003, Beltinger, C et al., 1999, Aragane, Y et al., 1998; Kischkel et al., 1995; Walczak y Sprick, 2001).

Las caspasas iniciadoras 8 y 10 activan la caspasa 3, y por consiguiente activan la apoptosis. En las células tipo I las caspasas 8 y/o 10 activan, inmediatamente después de ser activadas, a la caspasa 3, mientras que en las células tipo II aunque estas mismas dos caspasas activan la caspasa 3, su activación se realiza de forma indirecta mediante la activación inicial de la vía intrínseca (Scaffidi et al., 1998). La diferencia entre estos dos tipos de células radica en la cantidad de caspasa 8 y/o 10 que es activada al comenzar la apoptosis por la vía extrínseca. Cuando hay una gran cantidad de caspasas 8 y/o 10, éstas activarán directamente la caspasa 3, sin embargo cuando hay una baja concentración de caspasas 8 y/o 10, éstas activarán la proteína Bid, para que por medio de ésta se active la caspasa 3. Bid es un factor proapoptótico que provoca un daño en la permeabilidad de la mitocondria promoviendo la liberación de factores como AIF (factor inductor de apoptosis) y el citocromo C, que, en conjunto con el Apaf-1, activa la caspasa 9 (Gross et al. 1999). En el caso de la respuesta de las células HeLa al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP dado que no se detectó actividad de la caspasa 9, se puede inferir que las células HeLa utilizadas se comportan como células tipo II en respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP. Además, se puede concluir que logramos detectar la iniciación de la apoptosis antes de que se desarrollara la cascada de caspasas ya que avanzada la apoptosis la caspasa 9 también es activada por los mecanismos de retroalimentación que usa la célula para la apoptosis.

La información obtenida de estos experimentos excluye que el IMMUNEPOTENT CRP cause la apoptosis a células HeLa por medio de daño al DNA celular (bajo las condiciones usadas en los experimentos descritos), que es el mecanismo general de la quimioterapia y la radioterapia (Roos WP y Kaina B, 2006), a esta conclusión se llega considerando que no se detectó activación de ninguna de las dos caspasas iniciadoras de la vía intrínseca. Esto haría suponer que en el IMMUNEPOTENT CRP hay algún factor que promueve la activación de los receptores membranales de muerte.

IX. Conclusiones

En conjunto la información obtenida por ambos grupos de experimentos muestra que el IMMUNEPOTENT CRP, a una concentración de 1.25U/mL, produce apoptosis mediada por caspasas de la vía extrínseca en células HeLa. Además, el hecho de que la fracción de <1kDa es la que tiene mayor efecto citotóxico en estas células, nos hace suponer que la sustancia con mayor actividad es una molécula pequeña no proteica.

Los resultados arrojados por estos experimentos, abren una nueva línea de investigación sobre el IMMUNEPOTENT CRP y, futuros experimentos usando la fracción de <1kDa pueden llevar a conocer algunas de las moléculas presentes en esta mezcla que permitan seguir conociendo el modo de acción del IMMUNEPOTENT CRP. Es de interés conocer mejor este producto y sus componentes para poder compararlo con los tratamientos actuales, y así optimizar su uso.

Los resultados obtenidos permiten concluir que las células HeLa se comportan como células tipo II cuando son tratadas con 1.25 U/mL de IMMUNEPOTENT CRP. Además, estos resultados permiten proponer dos posibilidades para explicar la acción del IMMUNEPOTENT CRP sobre células HeLa: una es que el IMMUNEPOTENT CRP promueva la trimerización de los receptores de muerte en ausencia de ligandos (lo que se podría presentar como respuesta a la estimulación de la producción de dichos receptores), y la segunda es que éste contenga una molécula que promueva la liberación de ligandos de muerte en las células tumorales que causen la oligomerización de los receptores de muerte (figura 6). Es probable que el IMMUNEPOTENT CRP contenga una molécula promotora de la liberación de algún ligando como CD95L, o TRAIL, ya que esto ocurre en tratamientos con moléculas pequeñas, entre los que se encuentran la doxorubicina, bleomicina, y 5-fluorouracil (Fulda et al. 1997 a,b; Houghton et al. 1997; Muller et al. 1997; Debatin K-L, 2000). Además se ha demostrado que las células HeLa liberan ligandos de muerte como FasL y TRAIL, bajo ciertos estímulos (Wei X, et al. 2006; Ohtsuki T, et al. 2007; Catalano S, et al. 2007). Esta área de investigación se está comenzando a explorar en el laboratorio, pero todavía los resultados no son suficientes para apoyar una posibilidad sobre la otra. Adicionalmente se propone que se realicen experimentos que reproduzcan los estudios aquí descritos con otras líneas celulares,

para determinar si el IMMUNEPOTENT CRP actúa de forma igual o diferente dependiendo de la línea celular.

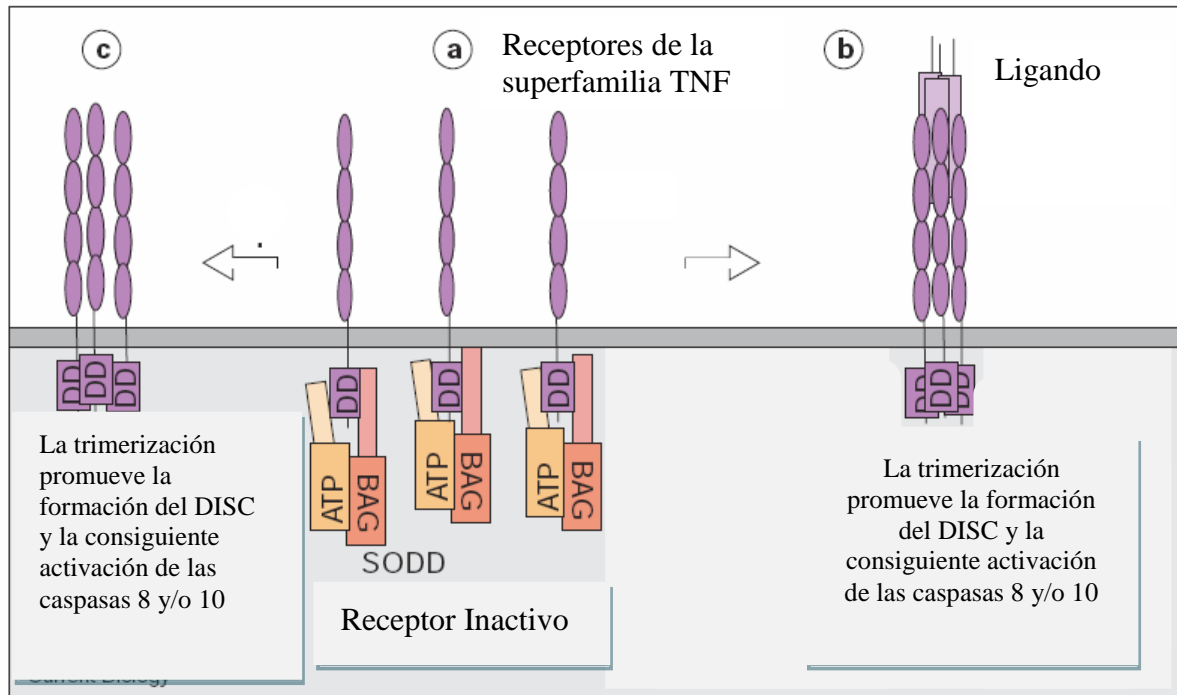


Figura 6. Adaptada de Tschopp, J et al. 1999 (Tschopp, J et al. 1999; Peter ME y Krammer PH, 2003; Wajant, H, 2003). Trimerización de Receptores de Membrana de la superfamilia de TNF.

Existen dos formas posibles de trimerización de los receptores de membrana. a) Los receptores de membrana comúnmente se encuentran inactivos, es decir sin trimerizar, debido a una serie de moléculas inhibitorias de la trimerización. b) Al unirse a su ligando, se trimerizan, iniciando la activación de moléculas adaptadoras y consecuentemente de las caspasas 8 y/o 10. c) Existen factores que inducen la trimerización de receptores como Fas y TNFR, en ausencia de ligando, iniciando de esta manera la activación de las caspasas 8 y/o 10.

X. Literatura Citada

1. American Cancer Society. 2007. Types of Immunotherapy.
Disponible en:
http://www.cancer.org/docroot/ETO/content/ETO_1_4X_Types_of_Immunotherapy.asp?sitearea=ETO
2. American Cancer Society. 2007. What Is Cancer?
Disponible en:
http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1x_What_Is_Cancer_-_Childhood_Cancers.asp?sitearea=
3. American Cancer Society. 2007. Guías de tratamiento de la ACS y la NCCN
Disponible en:
http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_2_1x_Guas_de_tratamiento_de_la_ACS_y_la_NCCN.asp
4. Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Poppelmann B, Luger TA, Schwarz T. 1998. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell. Biol.* 140:171–182
5. Ashkenazi, A. y Dixit, V. M. 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation *Science* 281: 5381, 1305 – 1308
6. Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Meyer E, Uckert W and Debatin KM. 1999. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8699–8704
7. Boldin M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85:, 803–815
8. Boyce, M. y Yuan, J. 2006. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13:363–73
9. Boyce, M., Degterev, A. y Yuan, J. 2004. Caspases: an ancient cellular sword of Damocles, *Cell Death and Differentiation* 11, 29–37
10. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. 1999. "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 269-90.

11. Castillo P. 2007. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre un modelo tumoral de melanoma murino. Tesis en proceso, como requisito para obtener el grado de maestro en ciencias. Laboratorio de Inmunología y Virología UANL
12. Catalano S, Rizza P, Gu G, Barone I, Giordano C, Marsico S, Casaburi I, Middea E, Lanzino M, Pellegrino M, Andò S. 2007. Fas ligand expression in TM4 Sertoli cells is enhanced by estradiol "in situ" production. *J Cell Physiol.* 211:2, 448-56.
13. Chabner BA y Roberts TG. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Cancer;* 5, 65-72
14. Chang, H.Y., Yang, X., 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821–846.
15. Chiara M., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Mol cell biology.* 8, 741-752
16. Chinnaiyan A.M. 1999. The Apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine. *Neoplasia.* 1(1): 5–15.
17. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR et al. 1996. Signal transduction by DR3, a death domain -containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274:990–2
18. Chung, Y., Kwan, J., Sungduck Lee, S., Cho, H. 2004. Synthesis and Cytotoxicity of Anilinomethyl-1,4-naphthoquinones. 1408 *Bull. Korean Chem. Soc.*, 25: 9
19. Coachman K., Ranish J., Hahn S. 2002. Silver Staining SDS PAGE Gels: Non-Kit based Silver staining Method. The Hahn Laboratory.
Disponibile en:
http://www.fhcrc.org/science/labs/hahn/methods/biochem_meth/silver_stain.htm
20. Colin Adrain, C., y Martin, J.S. 2006. Double Knockout Blow for Caspases. *Science.* 311. pp 785-786
21. Debatin K-M., 2000. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicology Letters* 112-113, 41-48.
22. Degterev A., Boyce M., Yuang J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567
23. Denault J-B., Salvesen G.S. 2002. Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death. *Chem. Rev* 102: 4489-4499
24. Ekert, P.G., Silke, J., Vaux, D.L., 1999. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 6, 1081–1086

25. Fadeel B, y Orrenius S. 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* 258: 479-517.
26. Fan T.-J., Han L.-H., Cong R.-S., Liang J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37:11, 719–727
27. Ferriols F., Ferriols R., Colomina J. 1997. Inmunoterapia Tumoral. Vacunas y Terapia Génica. *Farm. Hosp.* 21:03, 166-170
28. Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293:722–6
29. Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K., 2005 Apoptosis-based therapies and drug target. *Cell Death Differ.* 12:1, 942–961
30. Food and Drug Administration. 1998. BCG for Cancer
Disponibile en: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00053.html>
31. Food and Drug Administration. 1998. Levamisole Approved
Disponibile en: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00051.html>
32. Franco-Molina M.A., Mendoza-Gamboa E., Castillo-León L., Tamez-Guerra R.S., Rodríguez-Padilla C. 2004. Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock. *International Immunopharmacology* 4: 1577–1586
33. Franco-Molina M.A., Mendoza-Gamboa E., Miranda-Hernandez D., Zapata-Benavides P., Castillo-León L., Isaza-Brando C., Tamez-Guerra R.S., Rodríguez-Padilla C. 2006. Invitro effects of bovine dializable leucocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy* 8: 4, 408-414
34. Friedlander R.M. 2003. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med* 348:1365-75.
35. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi CA, Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. 1997a. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53 independent apoptosis via activation of caspases in neurodermal tumors. *Cancer Res* 57, 4965-4964
36. Fulda S., Sieverts H, Friesen C., Debatin KM. 1997b. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 57, 3823-3829
37. Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. 2007. Cell death Modalities: classification and Pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation* 14, 1237-1243

38. García J., Fernández J.M., Escaf F., Alvarez M., Rodríguez L., Martín J.L., San Martín A., Regadera J. 2007. Intravesical therapy: Influence on superficial bladder cancer progression. *Arch Esp Urol.*; 60:1, 31-5
39. Green D.R. 2003. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological Reviews.* 193: 5–9
40. Gross A, Yin X-M, Wang K, Wei M, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer S. 1999. Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome *c* Release, while BCL-X_L Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas. *Death J Biol Chem*, 274: 2, 1156-1163
41. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. 2006. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immunity & Ageing*, 3:5
42. Hail Jr. N., Carter B. Z., Konopleva M., Andreeff M. 2006. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys Vol. 11: 889-904
43. Haller DG. 2001. Update of clinical trials with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal cancer. *Semin Oncol.* 28:1, 25-30
44. Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* Vol. 100, 57–70
45. Han-Chung W., De-Kuan C., and Chia-Ting H. 2006. Targeted Therapy for Cancer. *Journal of Cancer Molecules* 2:2, 57-66
46. Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407, 770-776
47. Hetts S.W. 1998. To die or not to die: An Overview of Apoptosis and its Role in Disease. *JAMA* 279:4, 300-307
48. Ho P-K y Hawkins, C.J.. 2005. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS Journal* 272: 5436–5453
49. Hollander M., Wolfe D. 1999. Nonparametric Statical methods. Wilwy Intersciene Publication. 2a Edición
50. Houghton JA, Harwood FG, Tillman DM. 1997. Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via PAS signaling. *Proc. Naatl. Acad. Sci USA* 94, 8144-8149.
51. Instituto de Salud Pública. 2007. Servicios de Salud: Cancer Cervicouterino. Disponible en: <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=1011>
52. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2007. Estadísticas a Propósito del día Mundial contra el Cáncer.

Disponible en:

www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf

53. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M. 2007. Cancer Statistics, 2007 *CA Cancer J Clin* 57:43-66
54. Kaanders JHAM, Bussink J, van der Kogel AJ. 2002. ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *The Lancet Oncology*. 3: 12, 728-737
55. Kango-Singh M., Hadler G. 2004. Drosophila as an emerging model to study metastasis. *Genome Biol*, 5:4, 216
56. Kaufmann, SH, y G J. Gores. 2000. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays*. 22:1007–1017.
57. Kaufman RJ. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110:1389–98
58. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biology phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26: 239-57
59. Kim SJ, Zhang Z, Hitomi E, Lee YC, Mukherjee AB. 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet* 15:1826–34
60. Kirkpatrick CH. 2000. Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol Med* 6:3, 32– 41
61. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*; 14:22, 5579–5588
62. Kohler, C., Orrenius, S., Zhivotovsky, B.. 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods* 265. 97– 110
63. Kroemer, G. y Martin, S.J.. 2005. Caspase-independent cell death. *Nature Medicine* 11:7 pp. 725 – 730
64. Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Meter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G.. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*. 12, 1463-1467

65. Kumar, S. and Vaux, D.L., 2002. A Cinderella Caspase Takes Center Stage. *Science* 297, 1290-1291
66. Labrador, V., Fernández, P., Pérez, J., Hazen, M.. 2007. Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells *Cell Biology and Toxicology*, 23:3 pp. 189-199
67. Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V., Tschoopp J, Solary E, Dimanche-Boitrel M-T. 2003. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells *Oncogene* 22, 1807–1816
68. Laemmli U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227 (5259): 680-5
69. Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C.. 2005. Vital functions for lethal caspasas. *Oncogene* 24, 5137–5148
70. Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J. 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis *Cell*, **94**:4, 491–501.
71. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.*; 91:479–489.
72. Liang, H., Fesik, S.W., 1997. Three-dimensional structures of proteins involved in programmed cell death. *J. Mol. Biol.* 274, 291– 302
73. Liu H., Chang D.W., Yang X.. 2005. Interdimer Processing and Linearity of Procaspase-3 Activation. *Vol. 280, No. 12*, pp. 11578–11582
74. Liu X, Kim CN, Yang J, Temmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86:147–157
75. Lowe, S.W. y Lin, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. vol 21 no. 3 pp 485-495
76. Lymphoma Information Network. 2006. Monoclonal Antibody Therapy. Disponible en: <http://www.lymphomainfo.net/therapy/immunotherapy/mab.html>
77. Ma, X. y Yu, H. 2006. Global Burden of Cancer. *Cancer Issue. Yale J Biol Med.* 79(3-4): 85–94.
78. Meng XW, Lee SH, Kaufmann SH. 2006. Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Current Opinion in Cell Biology* 2006, 18:668–676
79. Mary C. Abraham y Shai Shaham. 2004. Death without caspases, caspases without death. *TRENDS in Cell Biology* Vol.14 No.4 April 2004

80. Masters J.R. 2002. HeLa Cells 50 Years on: the Good, the Bad and the Ugly. *Nature Reviews* 2, 315-319
81. Montgomery, C. 2004. *Diseño y análisis de experimentos*. Editorial Limusa. 2a Edición
82. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
83. Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofman WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle P. 1997. Drug Induced Apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wilg-type p53. *J. Clin. Invest* 99, 403-413
84. Murdoch D y Sager J. 2008. Will targeted therapy hold its promise? An evidence-based review. *Curr Opin Oncol.* 20:1, 104-11
85. Murray S. 2001. *Estadística, Serie Shaum*. Editorial McGraw-Hill. 3a Edición
86. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM.. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85:, 817–827
87. Nacional Cancer Institute. 2006. *Biological Therapies for Cancer: Questions and Answers*
Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/biological>
88. Nacional Cancer Institute. 2006. *Cancer Vaccine Fact Sheet*.
Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/cancervaccine>
89. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA . 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98–103
90. Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. 1997. Nicholson DW and Thornberry NA. *Trends Biochem.Sci.*, 22, 299–306.
91. Ohtsuki T, Tamaki M, Toume K, Ishibashi M. 2007. A novel sesquiterpenoid dimer parviflorene F induces apoptosis by up-regulating the expression of TRAIL-R2 and a caspase-dependent mechanism. *Bioorg Med Chem*.
92. Ooi, L., Wang, H., Luk, C.-W, y Ooi, V.E 2004. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* 94: 1, 117-122

93. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:552-65
94. Peter ME y Krammer PH. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation* 10, 26–35
95. Reed J.C. 2006. Drug Insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Oncology* 3:7 pp 388-396
96. Regueiro J.R., Lopez C., Gonzalez S., Martínez N. 2003. *Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune*. Ed Panamericana 3ª Edición. Pp 175-185
97. Roy, S. 2000. Caspases at the Heart of the Apoptotic Cell Death Pathway. *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 961-962
98. Samali, A., Boris Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., Orrenius, S.1999. Apoptosis: Cell death defined by caspase activation. *Cell Death and Differentiation.* 6, 495 ± 496
99. Sharifah, S.A., Tri Handayani, S., Azimahtol, L.P. 2007. Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer Cell International*, 7:4 pp 1-11
100. Shellman, Y., Howe, W., Miller, L., Goldstein, N., Pacheco, T., Mahajan, R., LaRue, S., Norris, D. 2007. Hyperthermia Induces Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis in Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancer Cells. *J Invest Dermatol.* Pp 1-8
101. Shi Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, Vol. 9, 459–470
102. Shi, Y. 2004. Caspase Activation, Inhibition, and Re-activation: A Mechanistic View. *Protein Science* 13, 1979-1987.
103. Simstein R, Burrow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights from the MCF-7 Cell Model System. *Experimental Biology and Medicine* 228: 995-1003
104. Smith L, Lind MJ, Welham KJ, Cawkwell L. 2006. Cancer Proteomics and Its Application to Discovery of Therapy Response Markers in Human Cancer. *Cancer*; 107:2, 232-41
105. Stennicke, H.R. y Salvesen, G.S.. 1999. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ.* 6,1054–1059
106. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. 2000. Apoptosis Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69:217–45

107. Thornberry N., Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies Within. *Science* 281: 1312-1316
108. Tschoop J., Ilrmer M., Thome M. 1998. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10, pp. 552–558.
109. Tschoop J, Martinon F, Hofmann K. 1999. Apoptosis: Silencing the death receptors. *Current Biology* 9:10
110. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death and Differentiation* 10, 45–65
111. Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84: 627–639
112. Walczak H. y Sprick, M.R. 2001 Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem. Sci.*, 26:, 452–453.
113. Wei X, Li CG, Nong S, Zhu XY, Huang XM. 2006. The influence of Solanum lyratum Thunb extract on apoptosis and the expression of fas/fasL genes in Hela cells. *Zhong Yao Cai*. 29:11, 1203-6
114. Wilk S. 2005. Apoptosis. *Sci. STKE* tr16 pp 1-2
115. Willis R.A. 1934. The spread of tumors in the human body. London: J. & A. Churchill. *British Journal of Surgery* Volume 22, Issue 85 , Pp 196
116. World Health Organization. 2001. Immunization, vaccines and biologicals: Vaccine Research and Development.
Disponible en: <http://who.int/vaccines/en/hpvr.d.shtml>
117. Zhang K, Kaufman RJ. 2006. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66:S102–9
118. Zheng, T.S., Flavell, R.A., 2000. Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Exp. Cell Res.* 256, 67–73.
119. Zhivotovsky, B. 2003. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem.* 39, 25–40



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

**“Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y de su
mecanismo de citotoxicidad sobre células HeLa”**

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener el título de
Químico Bacteriólogo Parasitólogo**

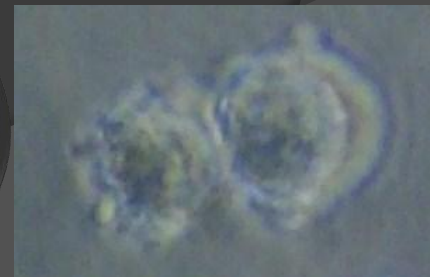
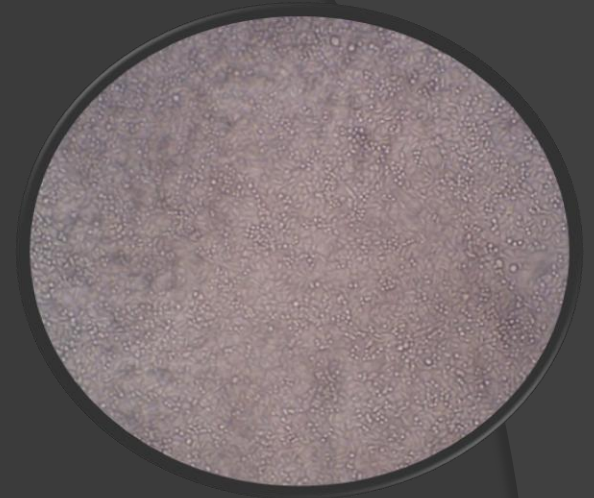
PRESENTA:

Ana Carolina Martínez Torres

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Introducción

- Cáncer
Cáncer cervicouterino
- Terapias
IMMUNEPOTENT CRP
- Apoptosis
Caspasas



Apoptosis

B. Fadeel & S. Orrenius, 2005. J. Intern. Med.

● Características

Afecta células individuales

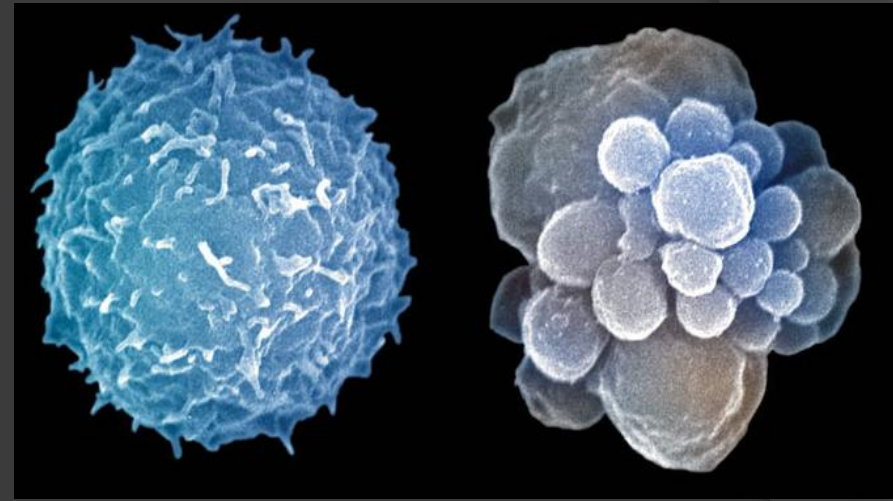
Regulado... pasos enzimáticos

Proteasas altamente específicas

Exposición de fosfatidilserina en membrana

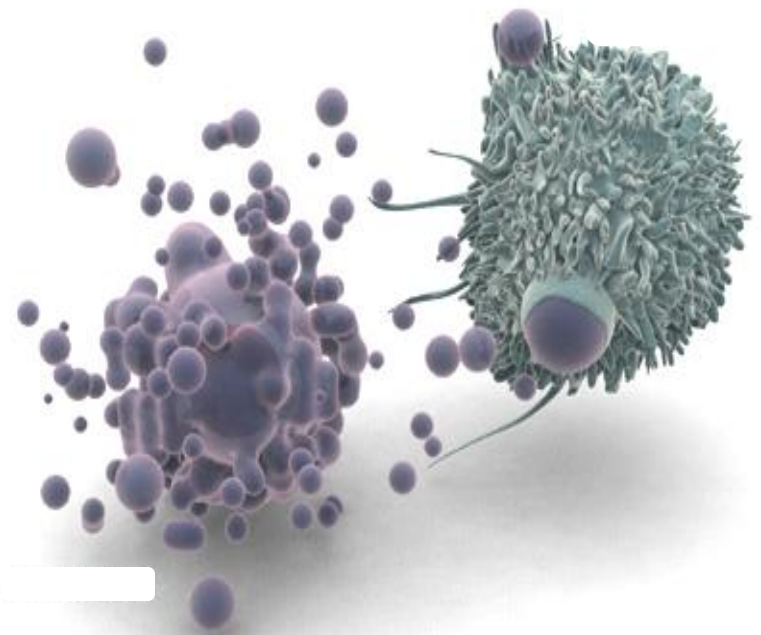
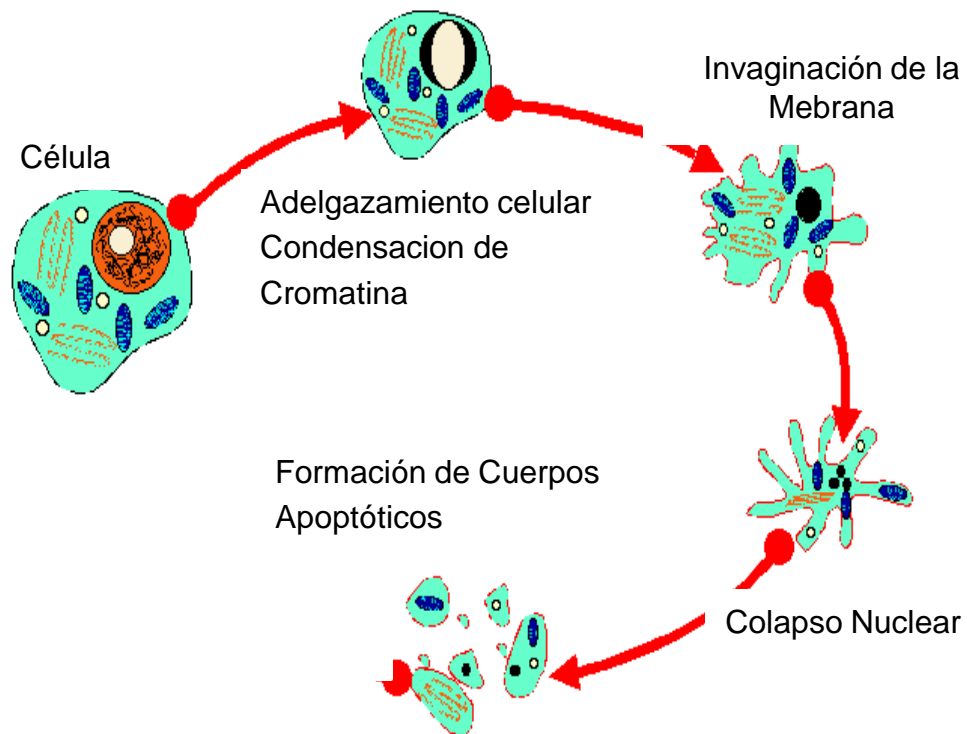
Fragmentación del DNA (mono y oligonucleosomal)

Ausencia de respuesta inflamatoria



Apoptosis

Cambios morfológicos:

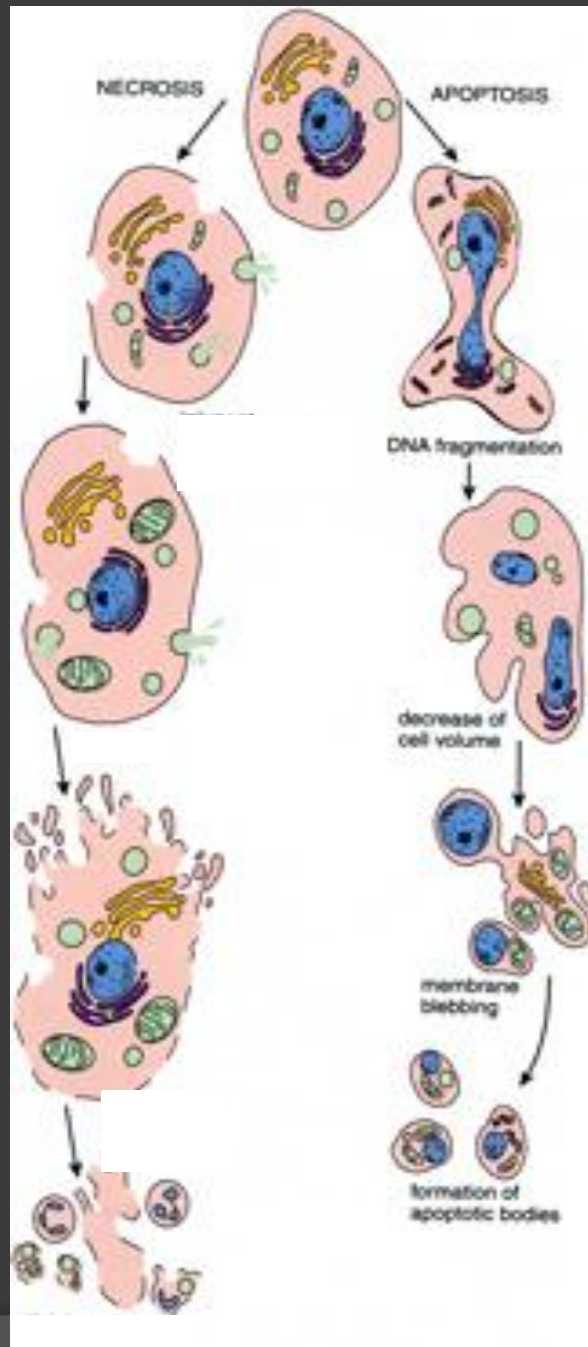


Daño en
Membrana

Hinchamiento

Ruptura de
membrana

Desintegración
e Inflamación



APOPTOSIS:

“Muerte limpia”

Apoptosis

Degterev A et al. 2003. *Oncogene*

● Elementos clave:

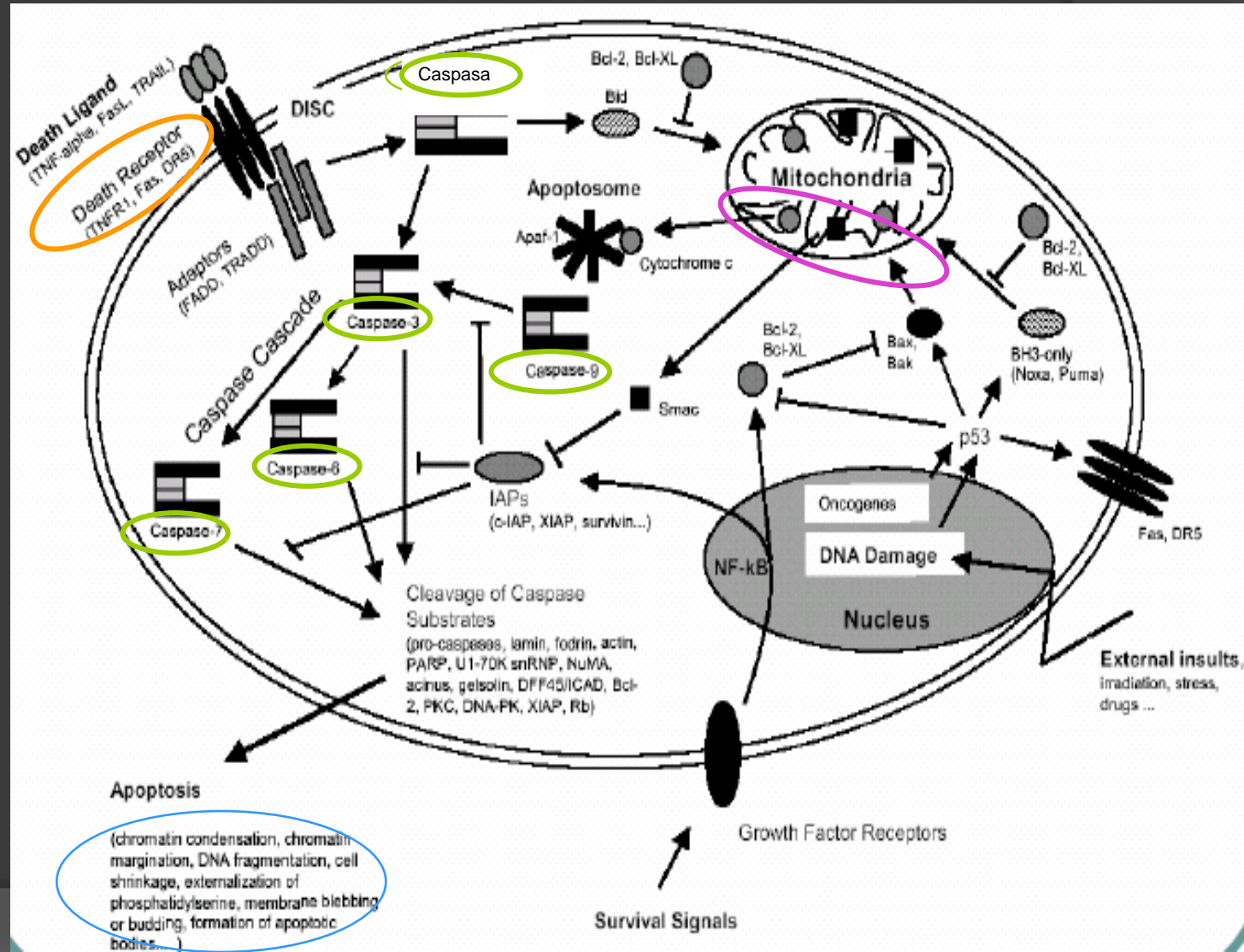
Receptores de muerte

Cambios mitocondria

Cascada de proteasas

caspasas

Alteraciones memb.



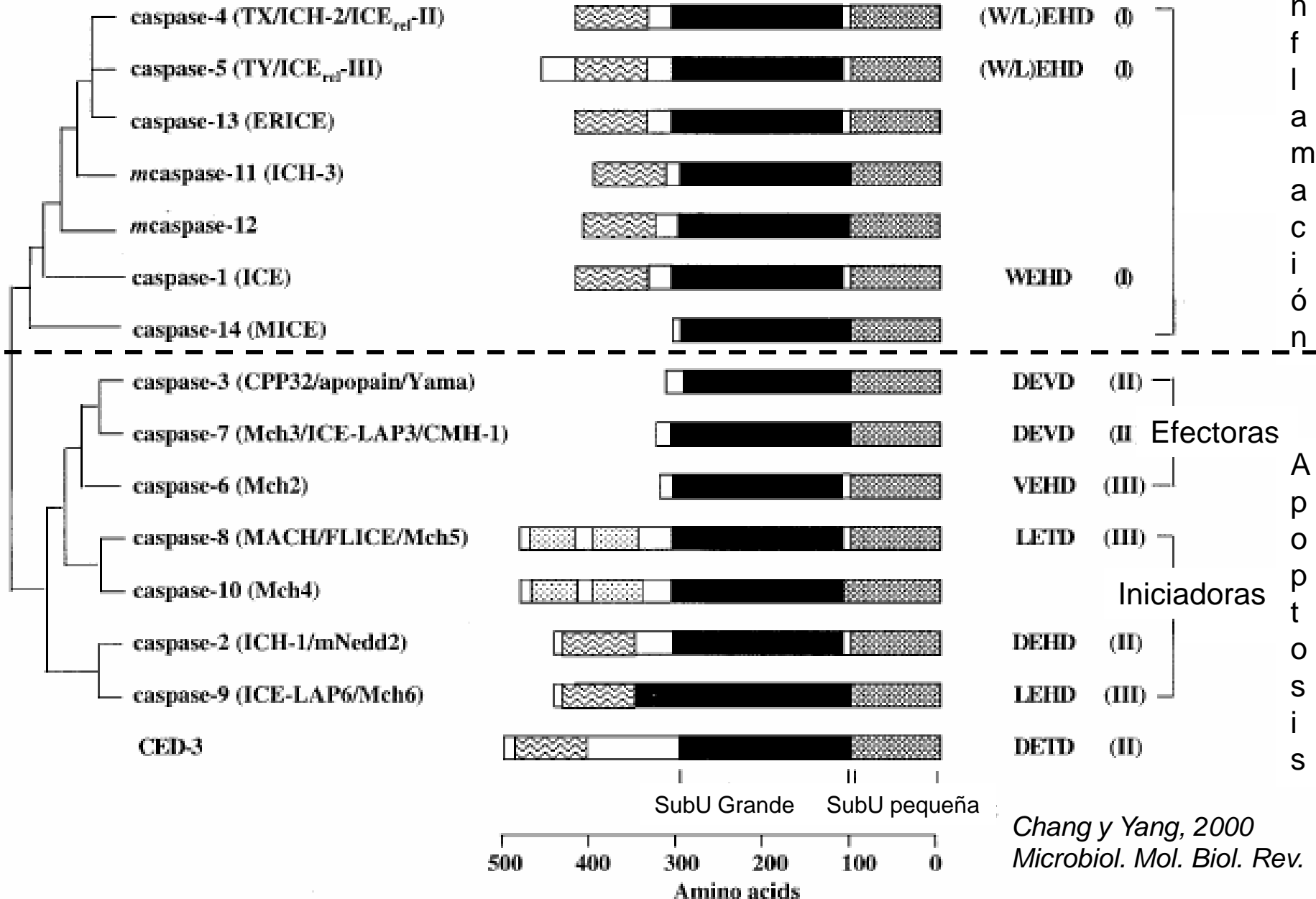
Homología de la secuencia

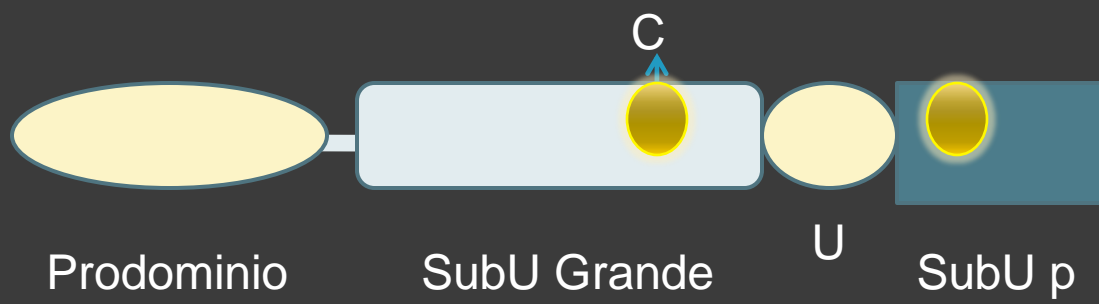
Estructura

Sustrato

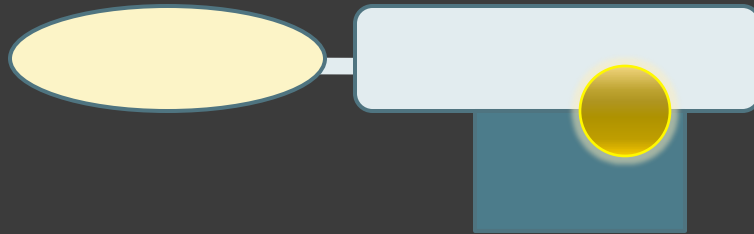
Función

Prodominio Dominio de la proteasa

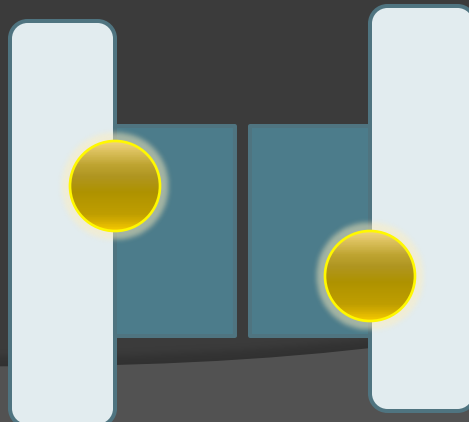




Procaspasa

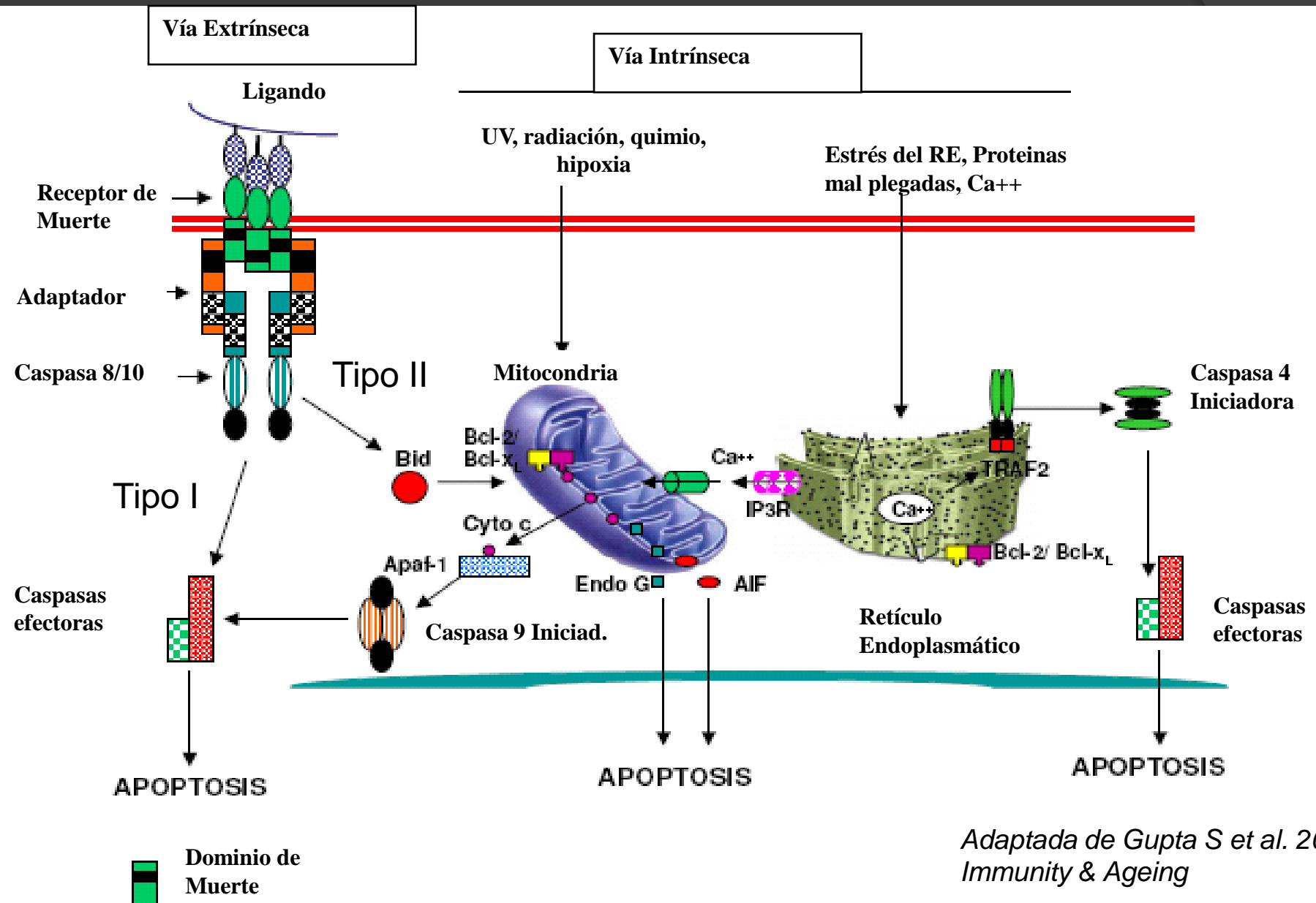


Enzima parcialmente
cortada



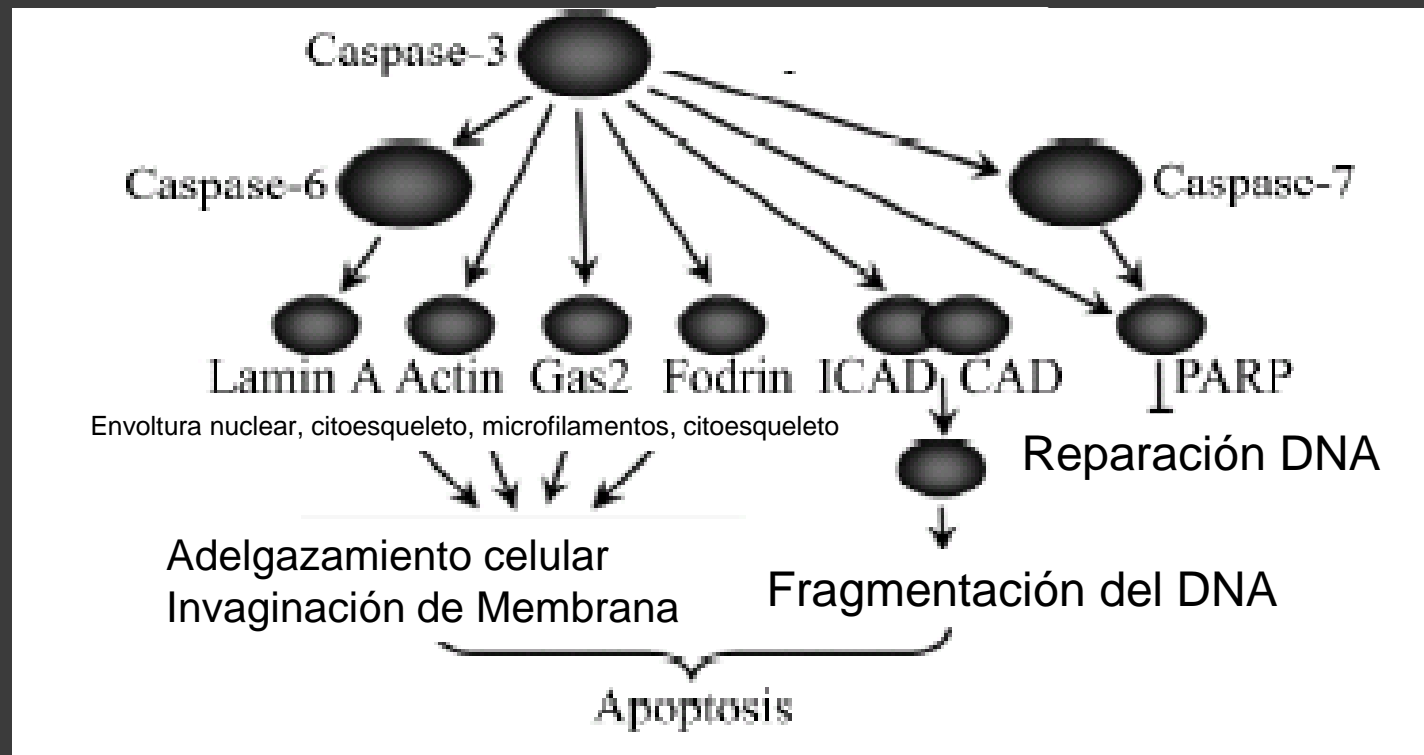
Caspasa Madura
y Activa

Vías de Apoptosis



Adaptada de Gupta S et al. 2006
Immunity & Ageing

Sustratos de Muerte



*Adaptada de Fan T.-J. et al. 2005.
Acta Biochimica et Biophysica Sinica*

HIPÓTESIS

Hipótesis

El IMMUNEPOTENT CRP causa muerte celular por apoptosis en células HeLa y diferentes fracciones tienen diferente efecto sobre la viabilidad celular de las mismas.

OBJETIVOS

Objetivos

1. Determinar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad de las células HeLa obteniendo la concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) para 24h de tratamiento.
2. Determinar si el IMMUNEPOTENT CRP induce apoptosis en células HeLa y de ser así por cuál vía actúa, mediante la detección de la activación de las caspasas 3/7 (efectoras), la detección de la activación de las caspasas 9 y 4 (vía intrínseca), y la detección de la activación de las caspasas 10 y 8 (vía extrínseca).
3. Determinar la o las fracciones activas del IMMUNEPOTENT CRP que tienen mayor efecto citotóxico sobre células HeLa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad celular

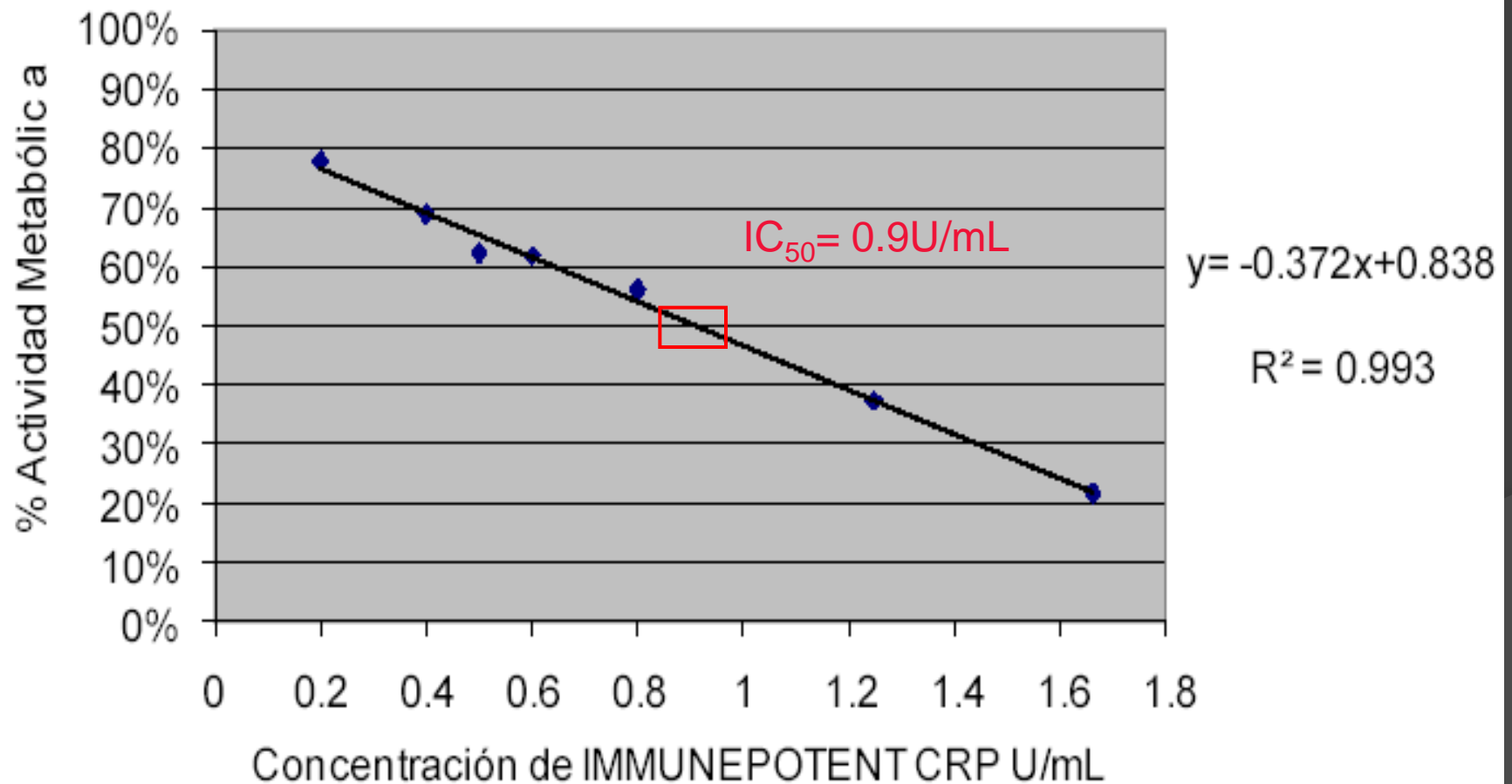
- Ensayo MTT

Sal de tetrazolio (MTT) --- Sal de formazán



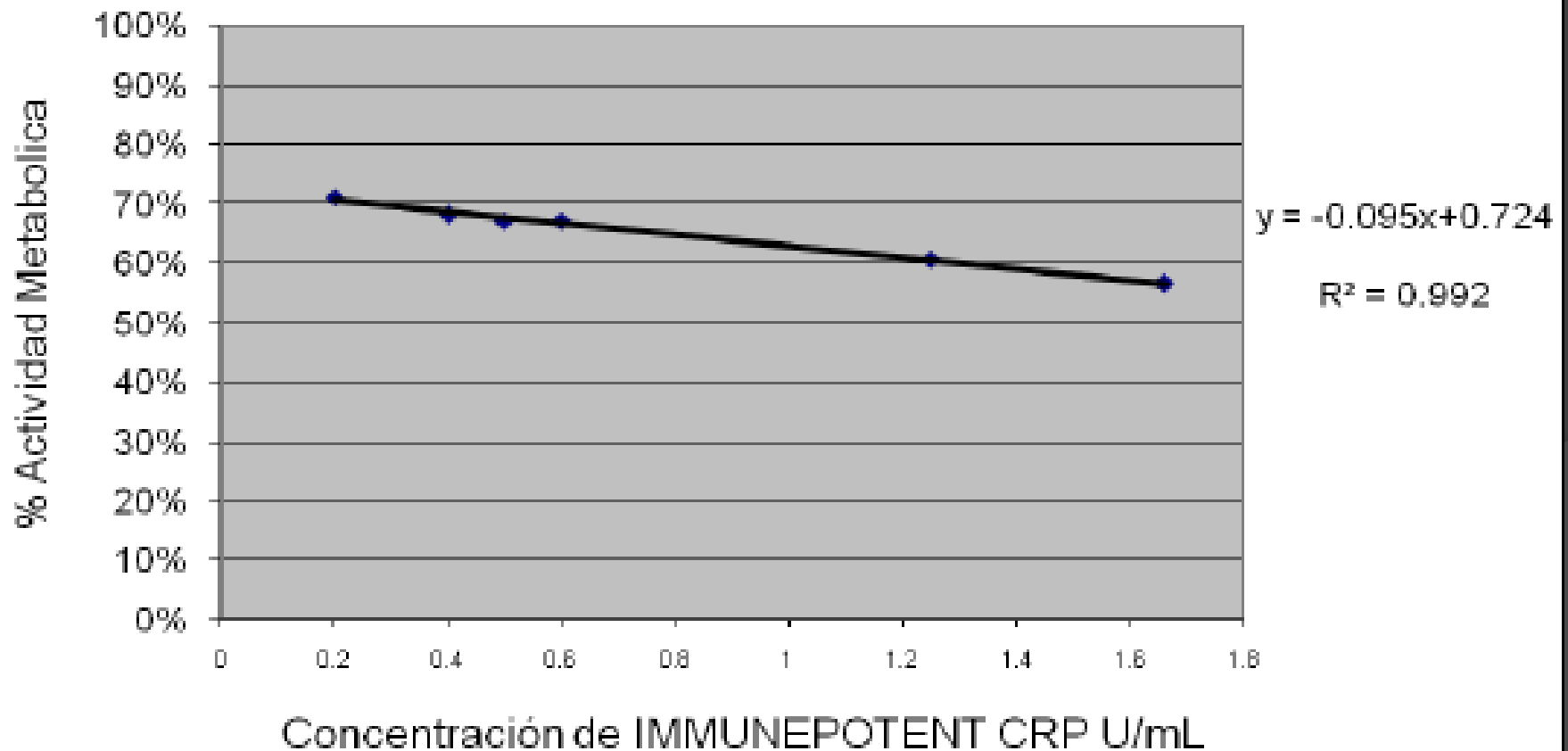
Ensayo MTT - HeLa

Actividad Metabólica de Células HeLa
a 24h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP



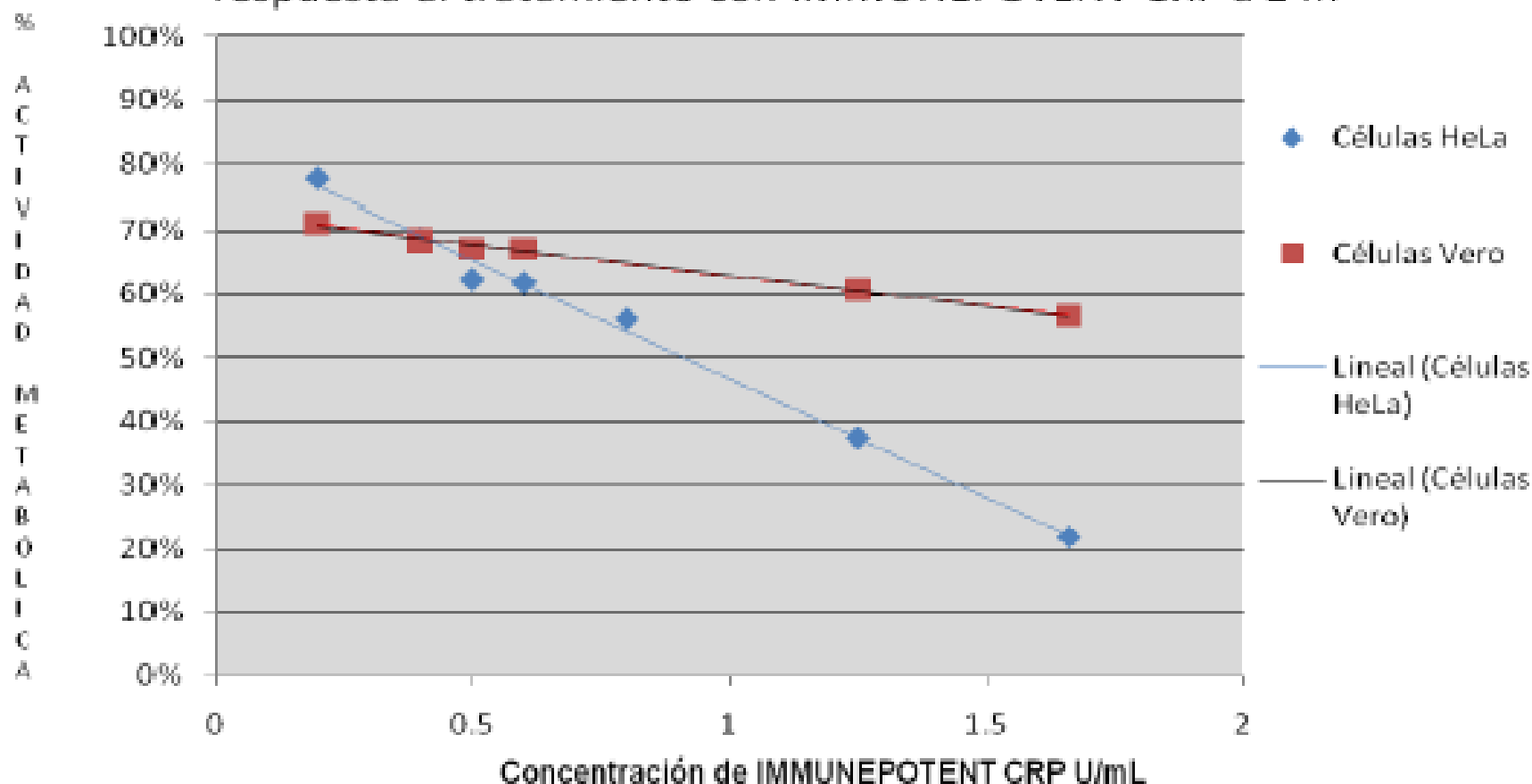
Ensayo MTT - Control

Actividad Metabólica en Células Vero a 24 de
tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP



Comparación MTT

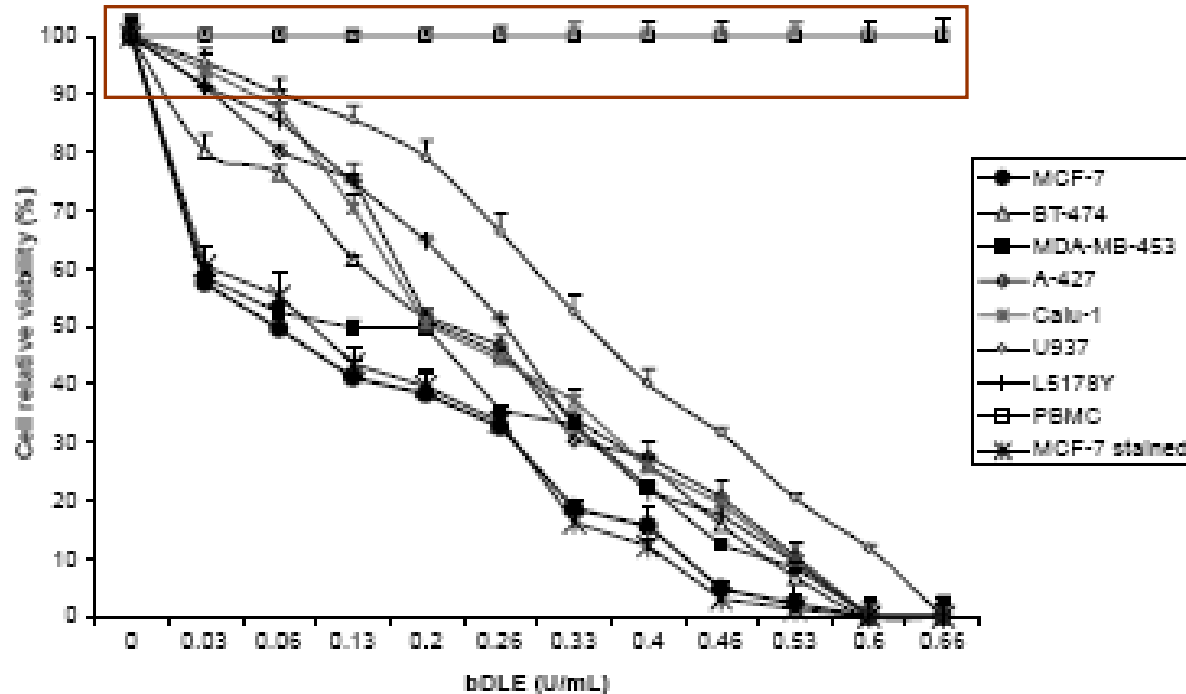
Comparación de la actividad metabólica de células HeLa y células Vero como respuesta al tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP a 24h



Reportes publicados

Células Mononucleares de sangre periférica

MA Franco-Molina, E Mendoza Gamboa, D Miranda-Hernandez, P. Zapata-Benavides, L. Castillo-León, C Isaza-Brando, RS Tamez-Guerra, C Rodríguez-Padilla. 2006. *Cytotherapy*



Con base en

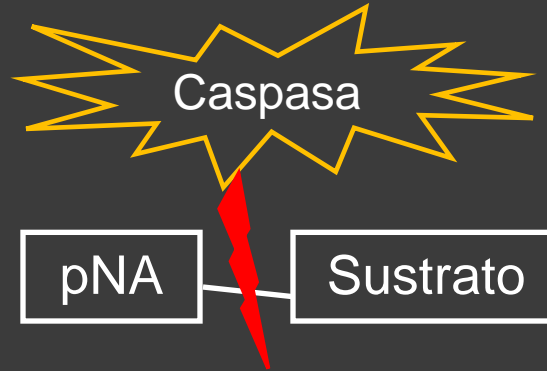
- EI IMMUNEPOTENT CRP causa apoptosis en células MCF-7 y B16F10

(MA Franco-Molina et al. 2006. Cytotherapy; Castillo P, Tesis en proceso, 2008)

- Observaciones de la morfología de las células HeLa a 4h, 8h, 20h, 24h, 48h, y 72 h de tratamiento



- EI IMMUNEPOTENT CRP disminuye la viabilidad de células HeLa



- Demostrar que existe una diferencia de magnitud entre el tratamiento y el control.

Tratamiento > Control

Absorbancia

Detección de activación de caspasas en células HeLa a 4h de incubación con IMMUNEPOTENT CRP

- El método utilizado no fue capaz de detectar activación de caspasas a 4h de tratamiento
- El control y los tratamientos no mostraron variación
- Siguiendo tiempo 8h

Actividad de caspasas en células HeLa a 8h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP

- El método utilizado arrojó una serie de datos que variaban entre réplicas pero mantenían el mismo patrón de diferencias entre la absorbancia del control y el tratamiento, por lo que se sometieron a análisis estadísticos.
- Además, se graficaron las absorbancias, se obtuvo media, mediana y desviación:

*Agradecimientos al
Dr. Mauricio Cabrera y su equipo*

Diagrama de cajas (Caspasa-3/7)

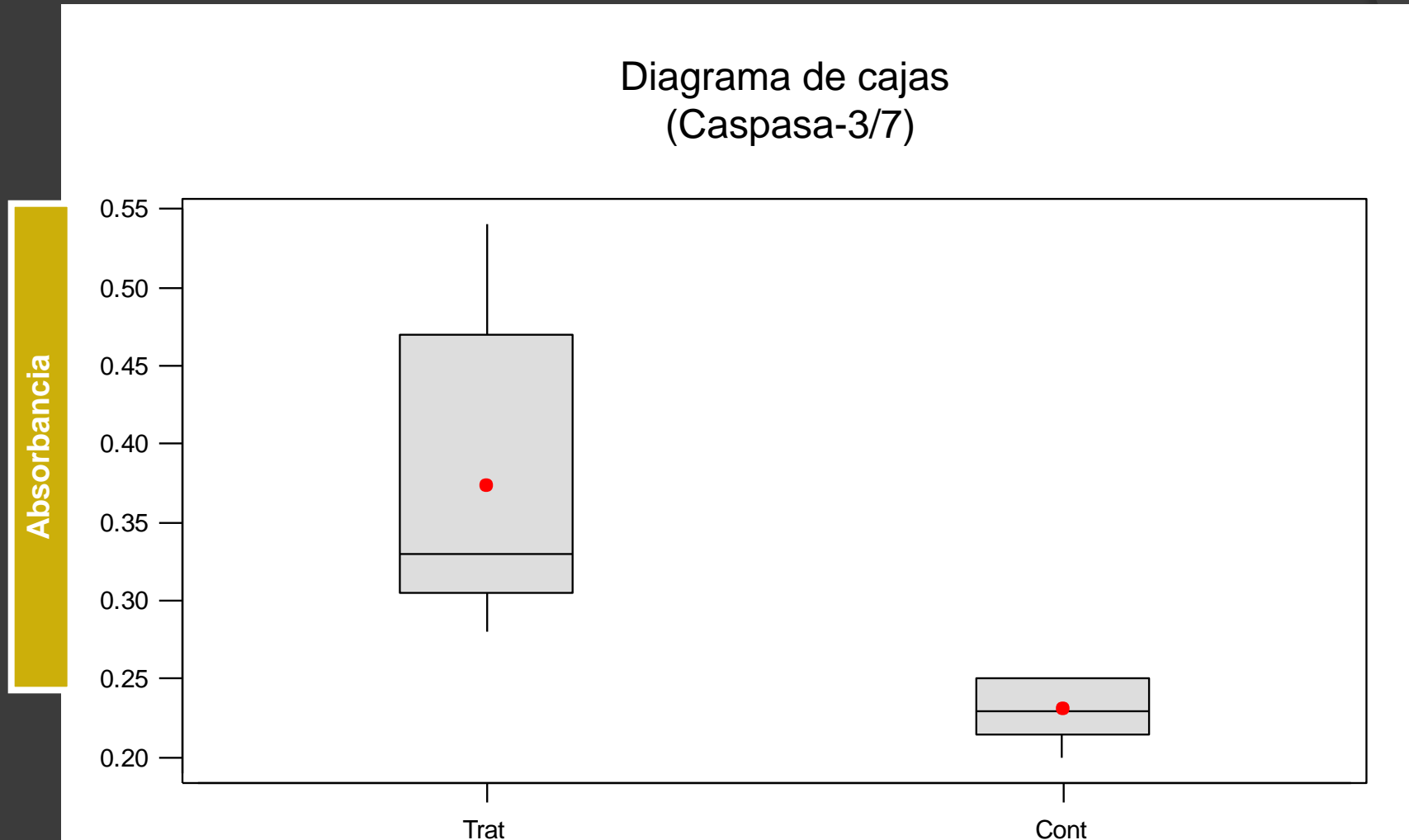


Diagrama de cajas (Caspasa-8)

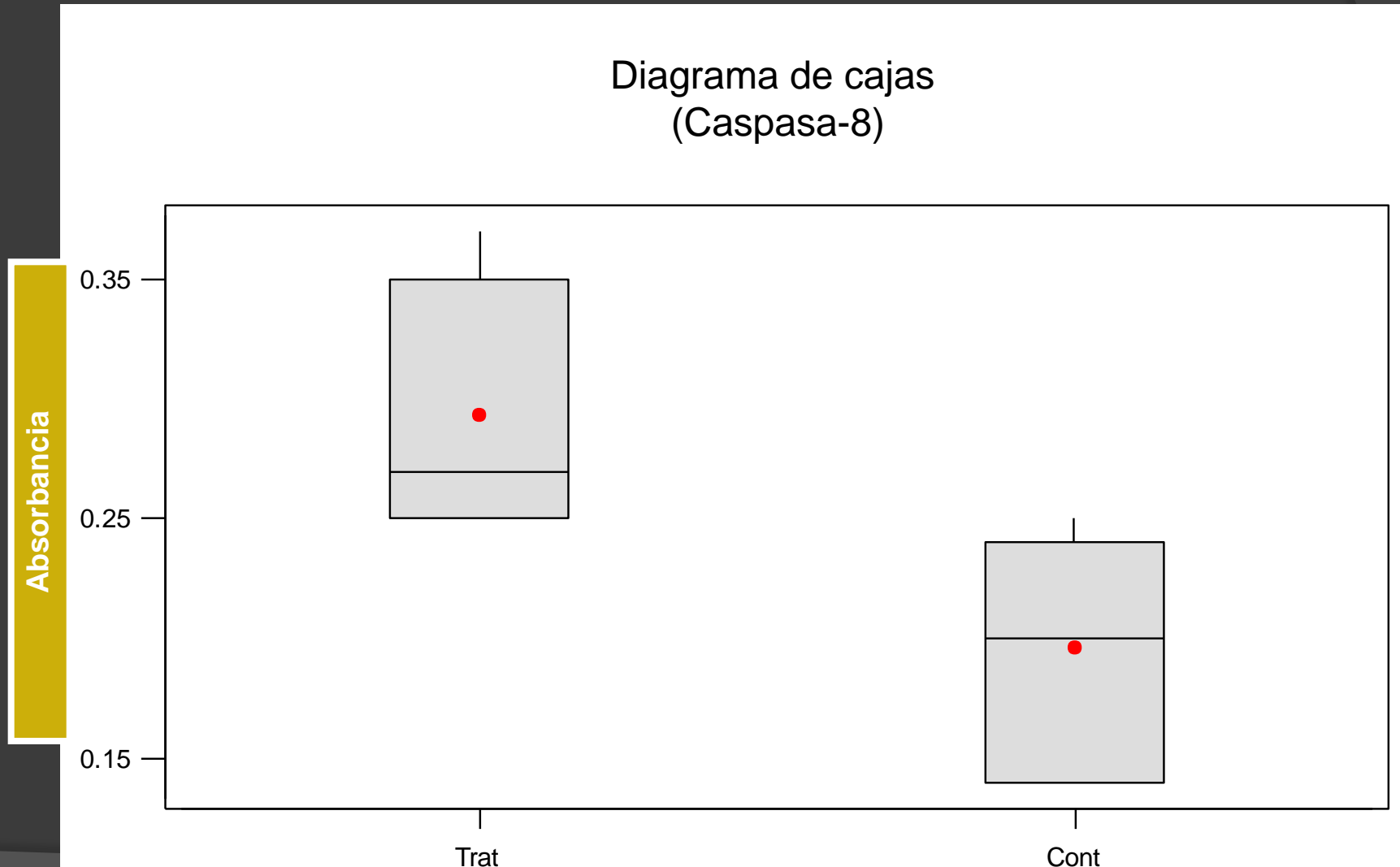
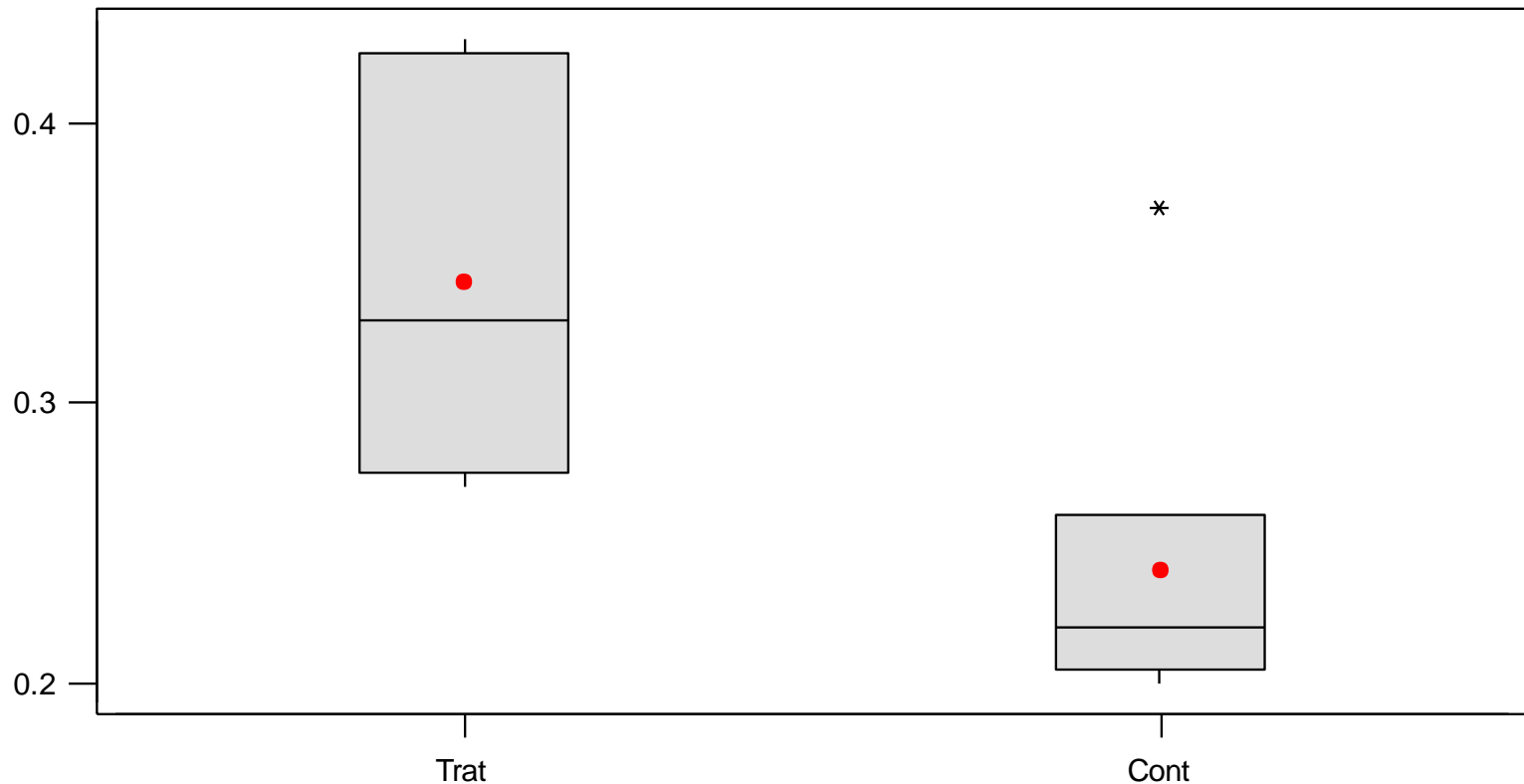


Diagrama de Cajas (Caspasa-10)

Diagrama de cajas
(Caspasa-10)



Absorbancia

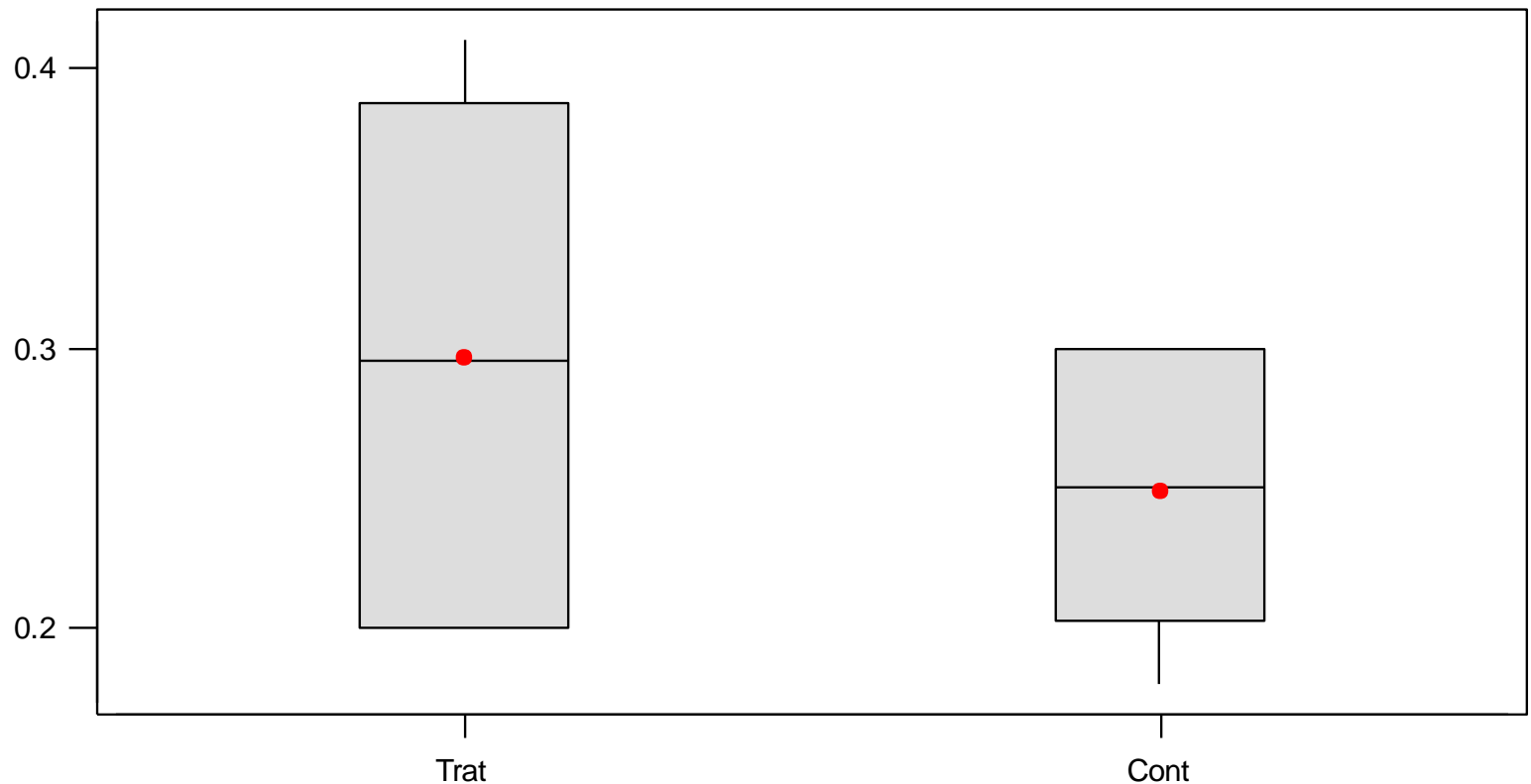
Diagrama de Cajas (Caspasa-9)

Diagrama de cajas
(Caspasa-9)



Diagrama de Cajas (Caspasa-4)

Diagrama de cajas
(Caspasa-4)



Absorbancia

Análisis estadístico:

- Prueba t de dos muestras con varianzas desconocidas:

Para muestras con distribución normal

- Prueba Mann-Whitney:
Prueba no paramétrica

- Ambas pruebas confirman que sí existe diferencia entre el nivel de absorbancia del tratamiento y el control para las caspasas 3-8-10, y que además es mayor la del control.

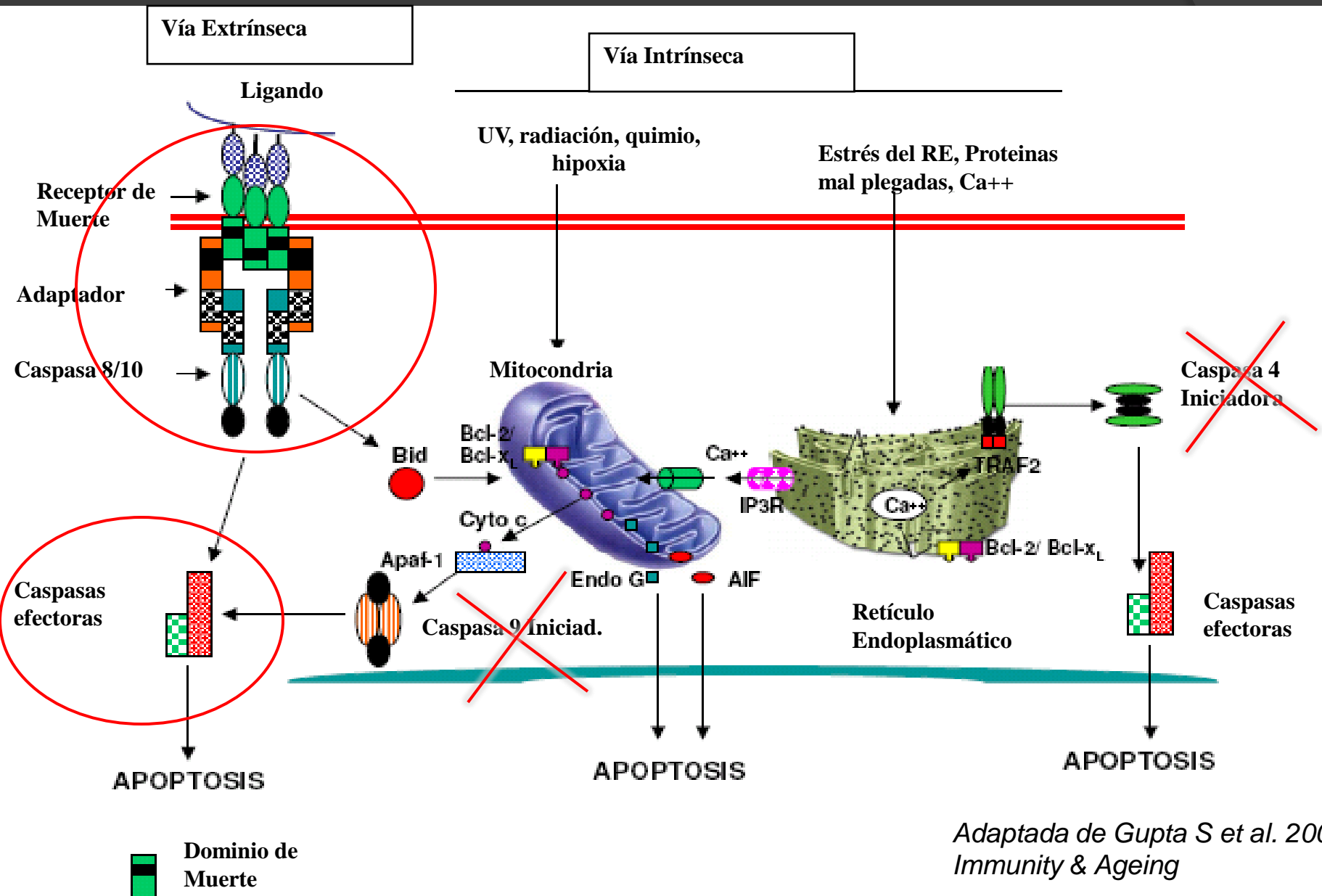
- Resultados confiables

*Agradecimientos al
Dr. Mauricio Cabrera y su equipo*

Actividad de caspasas en células HeLa a 8h de tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP

Caspasa	Actividad	Función
Caspasa -3	ACTIVA	EJECUTORA DE APOPTOSIS
Caspasa -4	ACTIVIDAD NO DETECTADA	INICIADORA DE LA VÍA INTRÍNSECA
Caspasa -8	ACTIVA	INICIADORA DE LA VÍA EXTRÍNSECA
Caspasa -9	ACTIVIDAD NO DETECTADA	INICIADORA DE LA VÍA INTRÍNSECA
Caspasa -10	ACTIVA	INICIADORA DE LA VÍA EXTRÍNSECA

Por lo tanto



Adaptada de Gupta S et al. 2006
Immunity & Ageing

Dado que

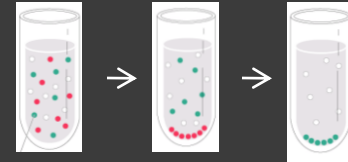
- El IMMUNEPOTENT CRP es una mezcla heterogénea de sustancias menores de 12kDa
- Distintas fracciones pueden tener diferente actividad

Se decidió

- Separar el IMMUNEPOTENT CRP en distintas fracciones
- Probar su citotoxicidad frente a células HeLa

Sulfato de Amonio

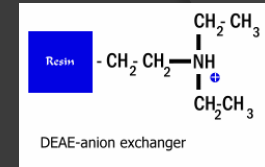
Saturación de la solución



Punto de solubilidad máxima de proteínas

- Se obtuvieron 5 fracciones -% saturación
- No se vio separación de proteínas; todas las bandas mostraron el mismo patrón

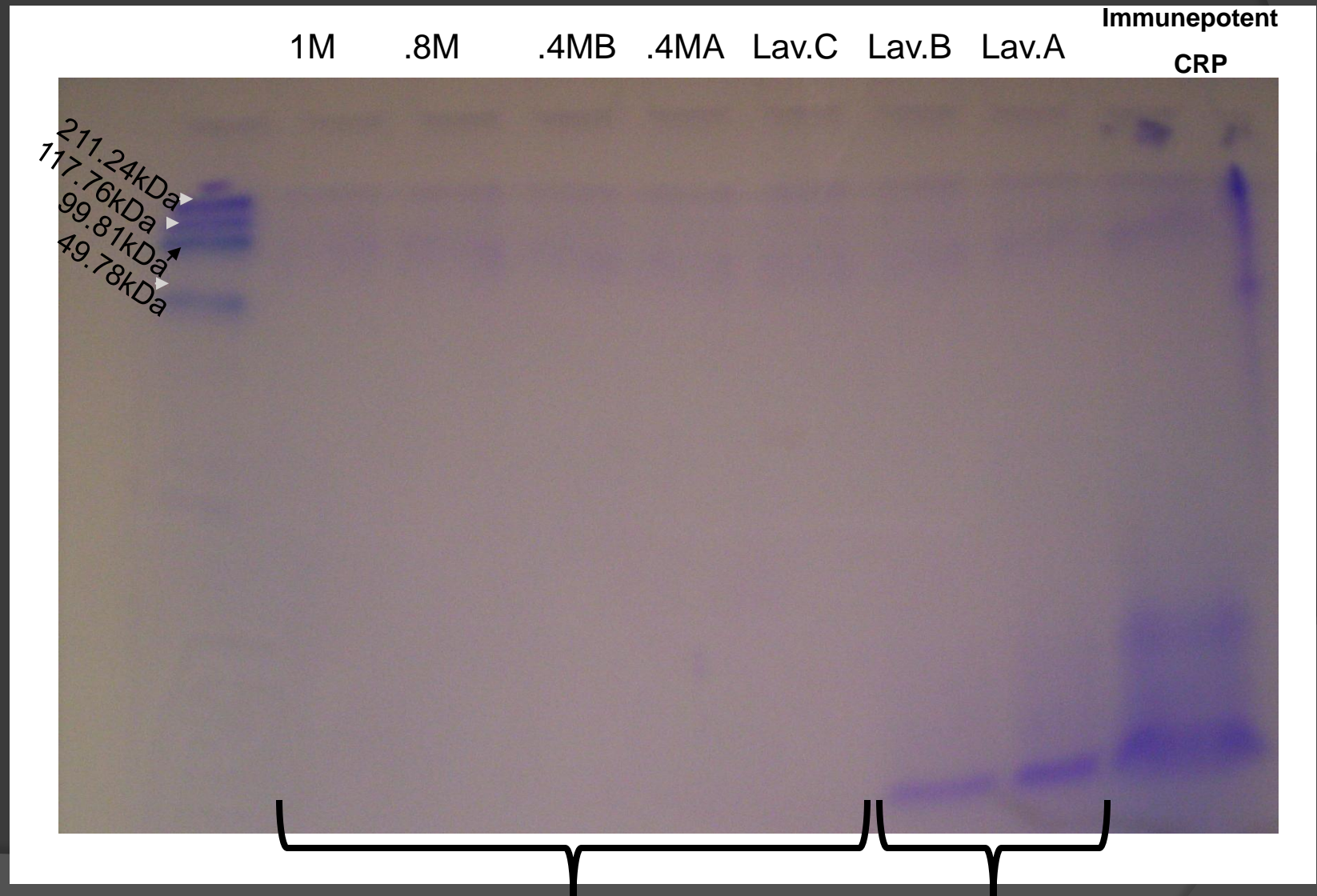
Cromatografía II



➤ Interacciones carga-carga

- Se obtuvieron 7 fracciones separadas por:
eluyente (H_2O o NaCl), concentración (NaCl), y
color (tonalidad de amarillo, ausencia de color)
- Lavado A [NaCl] 0.4M A,B
B 0.8M
C 1M

PAGE 15% - Tinción Azul de Coomassie



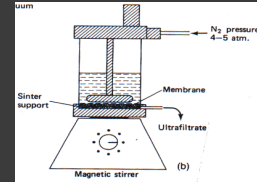
Remoción de NaCl, Liofilización y Tratamiento

- Columna de Intercambio de Sales
- Liofilización de las fracciones
- Tratamiento a Células HeLa



Se decidió que se usarían solo las 3 fracciones de los lavados

Ultrafiltración



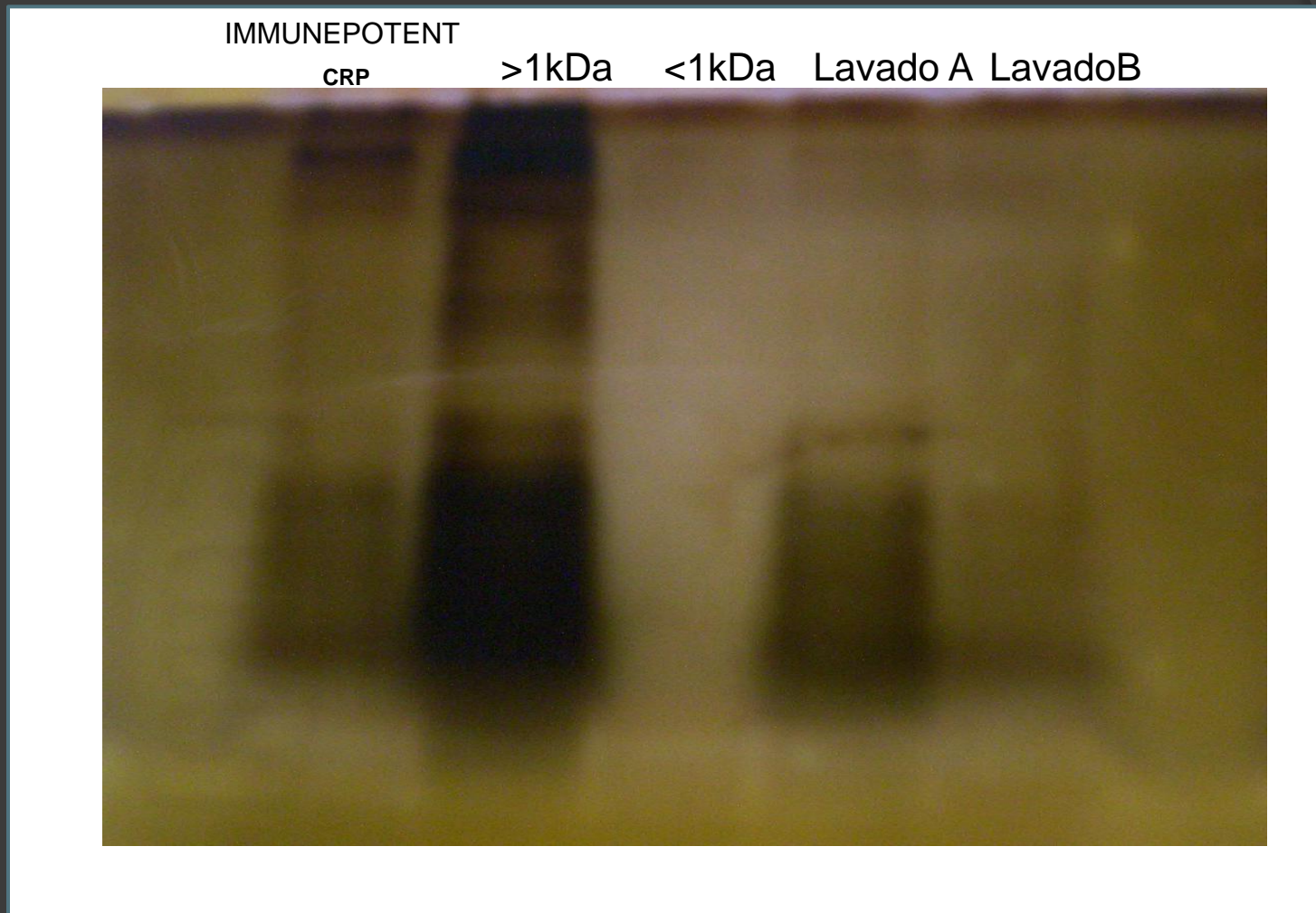
- Filtro con poro de 1kDa

- 2 Fracciones: <1kDa >1kDa

- Fracción de <1kDa

oligopeptidos con máximo 10aa

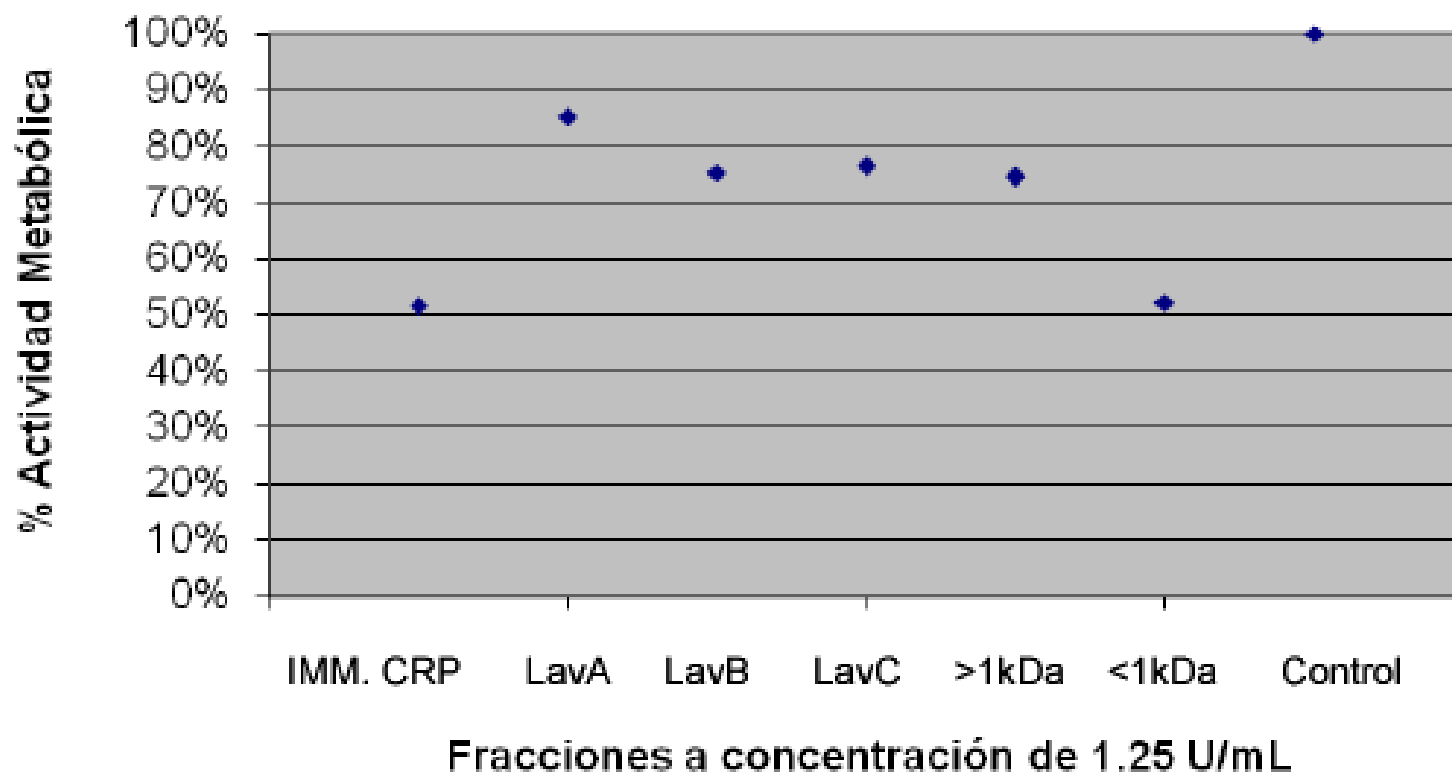
Page 15% - Tinción de Plata



Fracciones que presentan color

MTT Fracciones IMMUNEPOTENT CRP

**Actividad Metabólica de Células HeLa a 24h de Incubación
con Fracciones de
IMMUNEPOTENT CRP**



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

1. El IMMUNEPOTENT CRP es citotóxico frente a células HeLa, siendo la concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) de 0.9U/mL a 24h de tratamiento.
2. El IMMUNEPOTENT CRP induce muerte celular por apoptosis en células HeLa, por medio de la vía extrínseca.

Conclusiones

4. Las células HeLa se comportan como células tipo I al ser tratadas con IMMUNEPOTENT CRP.
5. La fracción del IMMUNEPOTENT CRP con mayor citotoxicidad frente a células HeLa es la fracción de $<1\text{kDa}$, no proteica.

Perspectivas

Se propone:

- Repetir estudios en otras líneas celulares (citotoxicidad, apoptosis, vías de apoptosis)
- Probar en células HeLa:
Ligandos de Muerte
- Hacer más estudios en la fracción de <1kDa de IMMUNEPOTENT CRP

Agradecimientos

- ◉ Dra. Cristina Rodríguez Padilla

- ◉ Dra. Clara Eugenia Isaza Brando
- ◉ Cecilia Ocampo
- ◉ Indira Molina
- ◉ Liliana Montañez

- ◉ Dr. Edgar Mendoza Gamboa

- ◉ Dr. Mauricio Cabrera
- ◉ Ing. Lyzett Uribe
- ◉ Ing. Hugo Pérez

- ◉ Dr. Moisés A. Franco Molina
- ◉ MC Leonardo Castillo León
- ◉ Biol. Paloma Castillo
- ◉ Magda Elizabeth Vera
- ◉ Don Catarino

- ◉ Dra. Diana Reséndez
- ◉ MC Janeth Salinas

Un Agradecimiento general a todos los miembros del laboratorio de Inmunología y Virología por todo el apoyo que me brindaron.

